

**Phänotypische und funktionelle
Charakterisierung
homöostatisch proliferierender T-Zellen
und deren Bedeutung für die Tumorkontrolle
im Mausmodell**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der Naturwissenschaftlichen Fakultät III

- Biologie und vorklinische Medizin der Universität Regensburg -



**vorgelegt von
Dipl.-Biol. Kerstin Schuster
aus Regensburg**

Regensburg im April 2008

Promotionsgesuch eingereicht am: 23.04.2008

Tag der mündlichen Prüfung: 14.07.2008

Diese Arbeit wurde angeleitet von Prof. Dr. A. Mackensen und Dr. C. Blank

Prüfungsausschuss: Vorsitz: Prof. Dr. R. Wirth

1. Prüfer: Prof. Dr. S. Modrow
2. Prüfer: Prof. Dr. A. Mackensen
3. Prüfer: Prof. Dr. R. Warth

"You can't rush science (...)!"

You can yell at it and scream at it, but you can't rush it."

('Abby Sciuto' in NCIS, Season 1, Episode 14, The Good Samaritan)

Für meine Eltern und Großeltern

....und für Onkel Josef

Inhaltsverzeichnis

I. EINLEITUNG.....	1
1. Homöostase des peripheren T-Zellpools	1
2. Die Lymphopenie-induzierte Proliferation	2
3. Toleranzinduktion durch zentrale und periphere Mechanismen	3
4. Aufheben der Selbsttoleranz: Autoimmunerkrankung und Tumorthherapie	5
5. Regulation der LIP	6
5.1 Modell 1: Wettstreit um limitierende Faktoren.....	8
5.2 Modell 2: Wettstreit um klonale Nischen.....	9
6. Die Memory-ähnliche T-Zelle.....	10
7. Ziel der Arbeit: Die phänotypische und funktionelle Charakterisierung der HP T-Zelle	12
II. METHODEN	13
1. Tumorzelllinien und Mäusstämme	13
1.1 Verwendete Tumorzelllinien.....	13
1.2 Verwendete Mäusstämme	14
1.3 Verwendete Mausmodelle.....	16
1.3.1 Mausmodell zur aHP von 2C TCRtg T-Zellen	16
1.3.2 Transfercolitis-Modell mit polyklonalen CD4 ⁺ T-Zellen	16
1.3.3 Das 2C Tumormodell mit HTR.c (Ld).....	16
1.3.4 Das 2C Tumormodell mit MC 57-SIY induziert (Kb).....	16
2. Methoden.....	17
2.1 in vivo Methoden	17
2.1.1 Bestrahlung von Mäusen.....	17
2.1.2 Transfer von T-Zellen in Mäuse.....	17
2.1.3 Transfer von Tumorzellen in Mäuse	17
2.1.4 Kontrolle von Tumorverlauf und Gewicht.....	17
2.1.5 Organentnahme	18
2.2 in vitro Methoden	18
2.2.1 Allgemeine Methoden	18
2.2.1.1 Zentrifugation.....	18
2.2.1.2 Ermittlung der Lebendzellzahl mittels Trypanblau-Färbung	18
2.2.2 Zellkultur.....	19
2.2.2.1 Splitten adhärent und nicht-adhärent wachsender Tumorzelllinien	19
2.2.2.2 Mycoplasmentest.....	19
2.2.2.3 Auftauen und Einfrieren von Tumorzelllinien	19
2.2.3 Isolierung muriner T-Zellen	20
2.2.3.1 Gewinnung naiver T-Zellen aus murinen Milzen	20
2.2.3.2 Dynal-Kit: Magnetische Zellseparation	20
2.2.3.3 SpinSep-Kit: Zellseparation über die Dichte.....	21
2.2.3.4 Gewinnung von LIP T-Zellen aus murinen Milzen und Lymphknoten	21
2.2.3.5 Aufreinigung von CD4 ⁺ CD25 ⁺ regulatorischen T-Zellen.....	22

2.2.4 in vitro Stimulation naiver T-Zellen und Restimulation	22
2.2.4.1 Stimulation von 2C TCRtg T-Zellen mit dem Tumor P815.B71	22
2.2.4.2 Stimulation polyklonaler T-Zellen mit dem T-Zell-Expander Kit	22
2.2.5 Analyse von Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie	23
2.2.5.1 Prinzip des FACS	23
2.2.5.2 Antikörperfärbung von Oberflächenmarkern	23
2.2.5.3 Labeling von 1B2	25
2.2.5.4 TCR V β Analyse	25
2.2.5.5 Intrazelluläre FACS-Färbung	25
2.2.5.6 CFSE Markierung	26
2.2.5.7 Lebend-tot-Färbung mit Propidium-Jodid (PI)	26
2.2.5.8 Apoptose-Nachweis mittels AnnexinV und PI	26
2.2.5.9 Standard-Analysen	27
2.2.5.9.1 Analyse der T-Zellaufreinigung	27
2.2.5.9.2 Analyse eines CFSE-Experiments	28
2.2.5.10 Zellsorting für Microarray Analysen von LIP T-Zellen	28
2.2.5.10.1 Polyklonale CD8 ⁺ LIP T-Zellen	29
2.2.5.10.2 Monoklonale 2C aHP T-Zellen	29
2.2.6 Immunhistochemische Methoden	29
2.2.6.1 Einbetten von Organen	29
2.2.6.2 Gewebeschnitte und Färbungen	30
2.2.6.2.1 Kryoschnitte	30
2.2.6.2.2 Färbung von Kryoschnitten mit Hämatoxylin/Eosin	30
2.2.6.2.3 Paraffinschnitte	30
2.2.6.2.4 Färbung von Paraffinschnitten mit anti-CD3 und Hämatoxylin	31
2.2.6.3 Dokumentation	31
2.2.7 in vitro Assays	31
2.2.7.1 ELISA	31
2.2.7.2 Proliferationsassay	32
2.2.7.3 ⁵¹ Cr-Release Assay	32
2.2.8 Immunopräzipitation und Pull-down Assay	33
2.2.8.1 Biotinylierung	33
2.2.8.2 Lyse	33
2.2.8.3 Immunpräzipitation und Pull-down Assay	33
2.2.8.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	33
2.2.8.4.1 Herstellung von 10%igen Gelen	34
2.2.8.4.2 Probenvorbereitung	34
2.2.8.5 Western Blot	34
2.2.8.6 Detektion	35
2.2.9 Statistik	35
III. ERGEBNISSE	36
1. Etablierung der Lymphopenie-induzierten Proliferation im Mausmodell	36
1.1 LIP in der chronisch-lymphopenen RAG2 ^{-/-} Maus	36
1.1.1 Induktion der aHP von 2C TCRtg T-Zellen	36
1.1.2 Induktion der aHP und der BLP von polyklonalen T-Zellen	37
1.2 LIP in der akut-lymphopenen bestrahlten C57BL/6 Maus	38

2. Charaktisierung des Phänotyps von aHP und LIP T-Zellen in Abgrenzung zu naiven und antigenaktivierten T-Zellen	39
2.1 Der Phänotyp monoklonaler aHP 2C TCRtg T-Zellen	39
2.2 Polyklonale aHP und BLP T-Zellen zeigen unterschiedliche Expressionsmuster der Oberflächenmarker	43
2.2.1 Analyse der Oberflächenmarker von aHP, BLP und NHP CD8 ⁺ polyklonalen T-Zellen im Vergleich mit naiven und antigenaktivierten Populationen	44
2.2.2 Oberflächenmarker der Subpopulationen CD4 ⁺ polyklonaler T-Zellen	46
2.3 Microarray-Analysen von LIP CD8 ⁺ T-Zellen bzw. von aHP 2C T-Zellen	48
3. Der Phänotyp von LIP bzw. aHP Memory T-Zellen: Ein stabiler und transplantabler Phänotyp?	49
3.1 Das Transfercolitismodell	50
3.1.1 P14 TCRtg T-Zellen verhindern eine Colitisinduktion	51
3.1.2 Die Colitisinduktion wird durch aHP polyklonaler CD4 ⁺ T-Zellen vermittelt	53
3.1.3 Transfer von LIP T-Zellen induziert auch in nicht-lymphopener Maus Colitis	53
3.1.4 LIP macht T-Zellen unabhängig von Co-Stimulation via CD28: Charakterisierung von LIP T-Zellen in vitro	54
3.1.5 LIP T-Zellen können durch Treg supprimiert werden	56
3.1.5.1 LIP CD4 ⁺ T-Zellen proliferieren in einer Wildtypmaus nicht	56
3.1.5.2 Co-Transfer von Treg inhibiert Colitisinduktion durch LIP T-Zellen in nicht-lymphopener Maus	58
3.1.5.3 Treg expandieren in gleichem Maß wie LIP CD4 ⁺ T-Zellen	59
3.2 Das 2C Tumormodell	60
4. Funktionell relevante Moleküle für die aHP	63
4.1 Funktioneller Einfluss von L-Selektin auf die Homöostatische Proliferation	63
4.1.1 L-Selektin defiziente T-Zellen zeigen verlangsamte aHP	63
4.1.1.1 Vergleich der T-Zellen von C57BL/6 und C57BL/6 CD62L ^{-/-} Mäusen	63
4.1.1.2 Abwesenheit der CD62L-Expression führt zu verminderter bzw. verzögerter aHP	65
4.1.2 aHP findet in sekundären Lymphorganen statt	66
4.1.2.1 LIP in der LTab ^{-/-} Maus: aHP benötigt intakte Lymphorgane	66
4.1.2.2 Lymphknoten sind die bevorzugten Kompartimente für aHP T-Zellen	67
4.1.2.2.1 Wildtyp T-Zellen akkumulieren während der aHP im Lymphknoten	67
4.1.2.2.2 T-Zellen mit einem Defekt in der CD62L-Expression können nicht im gleichen Maß in Lymphknoten einwandern wie WT T-Zellen	70
4.1.3 T-Zellen mit CD62L-Defekt können Tumorzellen zwar in vitro attackieren, jedoch in vivo nicht kontrollieren	72
4.1.3.1 2C CD62L ^{-/-} und 2C T-Zellen besitzen in vitro vergleichbare lytische und proliferative Aktivitäten	72
4.1.3.2 Im Gegensatz zur in vivo Kontrolle des Tumorstwachstums hat die Abwesenheit von CD62L ^{-/-} keinen Einfluss auf die direkte T-Zell-TAA-Interaktion unter in vitro Bedingungen	73
4.2 PD-1-Überexpression wirkt inhibitorisch auf die aHP 2C TCRtg T-Zellen	75
4.2.1 Regulation der PD-1 Expression von 2C TCRtg T-Zellen	76
4.2.2 2C und 2C PD1 ^{-/-} T-Zellen zeigen in vivo eine stärkere aHP als 2C PD1tg T-Zellen	77

IV. DISKUSSION	80
1. Induktion der LIP im Mausmodell unter chronisch- und akut-lymphopenen Bedingungen	80
2. Der Phänotyp von aHP T-Zellen und BLP T-Zellen	83
3. Der aHP Phänotyp ist stabil und transplantabel	84
4. LIP T-Zellen werden unabhängig von der Co-Stimulation via CD28, bleiben aber durch regulatorische T-Zellen kontrollierbar	88
5. Identifizierung von CD62L und PD-1 als funktionell relevante Moleküle für die aHP	89
6. Der aHP Phänotyp: Früher Effektor- oder Memory Phänotyp?	97
7. Ausblick	99
 V. ZUSAMMENFASSUNG	100
 VI. ANHANG	102
1. Der "Zweite Rezeptor" für PDL-1 und PDL-2: Ein Nebenprojekt	102
2. Material und Geräte	105
3. Puffer und Lösungen	105
4. Anbieterverzeichnis	108
 VII. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	109
 VIII. LITERATURVERZEICHNIS	110

I. Einleitung

1. Homöostase des peripheren T-Zellpools

Walter Cannon, ein amerikanischer Physiologe, definierte bereits in den 30er Jahren den Begriff der Homöostase als einen sich selbst regulierenden Prozess, welcher die Stabilität eines biologischen Systems aufrecht erhält (Cannon, 1932). Tritt eine Störung dieses Gleichgewichts auf, so wird das System stets versuchen, seinen ursprünglichen Status wiederherzustellen (Cannon, 1932; Marrack et al., 2000; Stockinger et al., 2004a).

Auch die Anzahl peripherer T-Zellen im Immunsystem von Säugetieren wird mittels homöostatischer Mechanismen zeitlebens relativ konstant gehalten. Periphere T-Zellen sind in zwei verschiedenen Zellpools, dem naiven Zellpool und dem Memory/Effektor Zellpool, organisiert. Eine getrennte Regulation dieser beiden Pools stellt sicher, dass das adaptive Immunsystem sowohl durch ausreichend naive T-Zellen gut gegen neuartige Pathogene gerüstet ist, als auch über ein genügend großes Repertoire an Memory T-Zellen verfügt, die eine schnelle Immunantwort gegen bereits bekannte Fremdanigene ermöglichen (Stockinger et al., 2004a). Klassischerweise wird der naive T-Zellpool durch den Export naiver T-Zellen aus dem Thymus aufgefüllt (Tanchot and Rocha, 1997), und der Memory Pool wird nach Infektionen um langlebige Memory T-Zellen verstärkt, wobei jedoch über 90% der Effektorzellen durch Apoptose absterben, und nur wenige T-Zellen zu Memory T-Zellen werden (Goldrath and Bevan, 1999b).

Ist die Anzahl der T-Zellen zusätzlich in der Peripherie zu gering, so beginnen diese kurzfristig zu proliferieren, um das entstandene T-Zelldefizit zu beseitigen. Diese Proliferation erfolgt dabei unabhängig vom Kontakt mit Fremdanigenen (Prlic and Jameson, 2002; Stockinger et al., 2004a). Neugeborene sind z.B. während der ersten Lebenstage lymphopen, und die Peripherie wird erst nach und nach mit neugebildeten T-Zellen aus dem Thymus aufgefüllt (Ichii et al., 2002; Le Campion et al., 2002; Min et al., 2003). Im Alter lässt die Produktion naiver T-Zellen im Thymus nach, was zu einer Verringerung des naiven peripheren T-Zellpools führt. Auch diese leichte Lymphopenie kann durch die homöostatische Regulation wieder ausgeglichen werden (Prlic and Jameson, 2002). Infektionen mit z.B. HIV führen zu einem großen T-Zelldefizit (Margolick and Donnenberg, 1997), und auch im Zuge T-Zell depletierender Chemo- oder

Strahlentherapien kommt es zu schwerer Lymphopenie (Prlic and Jameson, 2002; Stockinger et al., 2004a).

2. Die Lymphopenie-induzierte Proliferation

Experimentell kann die homöostatische Proliferation durch den Transfer peripherer T-Zellen in lymphopene Mäuse simuliert werden. Geeignete Modelle sind dafür z.B. RAG-/- (recombinant-activation-gene defiziente) (Cho et al., 2000) oder SCID (severe-combined immunodeficiency) Mäuse (Pettersson and Gronvik, 2003), welche aufgrund genetischer Defekte in der Peripherie keine T- und B-Zellen bzw. weder T-, B- noch NK-Zellen besitzen, oder aber bestrahlte Wildtypmäuse (Tan et al., 2002). Erste Versuche zur Expansion peripherer T-Zellen in Nagetiermodellen wurden bereits in den 80er Jahren unternommen (Bell et al., 1987; Miller and Stutman, 1984), doch erst ab 1999 wurde diese Fremdantigen-unabhängige Proliferation naiver T-Zellen unter lymphopenen Bedingungen als sog. „Lymphopenie-induzierte homöostatische Proliferation“ definiert: Ein Prozess, welcher die ursprüngliche T-Zellzahl nach einer Störung der Homöostase des peripheren T-Zellpools wiederherstellt (Ge et al., 2001). Diese „Lymphopenie-induzierte homöostatische Proliferation“, kurz LIP, wird von einigen Gruppen in zwei proliferative Prozesse aufgeteilt, welche gemeinsam stattfinden: Eine langsam ablaufende (akute) Homöostatische Proliferation (aHP) und in eine deutlich schnellere sog. Burst-like (Endogene, Spontane) Proliferation, kurz BLP (Kieper et al., 2005; Min et al., 2005). Diese Einteilung wurde auch für diese Arbeit beibehalten.

Basierend auf Daten mit MHC-defizienten Mäusen wurde gezeigt, dass die aHP naiver T-Zellen abhängig vom Kontakt des T-Zellrezeptors (TCR) zu Haupthistokompatibilitätskomplexen (MHC) ist, jedoch unabhängig von co-stimulatorischen Signalen, welche über CD28 oder CD40L vermittelt werden (Prlic and Jameson, 2002). Allerdings sind die MHC im Fall der aHP nicht mit Peptiden beladen, die aus Fremdantigenen prozessiert wurden, sondern mit Eigenantigenen, den sog. self-Peptiden (Kieper and Jameson, 1999). Die Mehrheit der Arbeiten geht davon aus, dass es sich bei diesen self-Peptiden um die gleichen Peptide handelt, die auch bei der T-Zellreifung im Thymus eine entscheidende Rolle für die positive Selektion spielen (Ernst et al., 1999; Goldrath and Bevan, 1999a; Viret et al., 1999).

Dass die Erkennung von Komplexen, bestehend aus self-MHC und self-Peptid, nicht auf den Thymus beschränkt ist, sondern auch eine wesentliche Voraussetzung für die aHP darstellt, konnte mit folgenden Versuchen gezeigt werden: H2-M knockout Mäuse tragen einen genetischen Defekt in der α -Kette des Heterodimers H2-M $\alpha\beta$. Da dieses Heterodimer zur Beladung der MHC-Moleküle benötigt wird, sind alle MHC II Moleküle mit „class II-associated invariant chain Peptiden“, kurz CLIP genannt, beladen (Fung-Leung et al., 1996; Martin et al., 1996; Miyazaki et al., 1996). Im Gegensatz zu T-Zellen, welche in einem H2-M knockout Tier gereift sind, zeigen Wildtyp T-Zellen nach Transfer in ein lymphopenes H2-M knockout Empfängertier keine aHP, denn diese T-Zellen finden in der Peripherie nicht die benötigten self-Peptide ihrer eigenen positiven Selektion vor (Viret et al., 1999). Auch transgene OT-I T-Zellen zeigen nur dann in „transporter associated with antigen processing“ defizienten (TAP^{-/-}) Mäusen nach T-Zelldepletion aHP, wenn die MHCs mit dem self-Peptid beladen sind, das für die positive Selektion von OT-I T-Zellen im Thymus benötigt wird (Goldrath and Bevan, 1999a).

3. Toleranzinduktion durch zentrale und periphere Mechanismen

Während der T-Zellreifung im Thymus werden die neu arrangierten TCR auf ihre Affinität zu Komplexen aus self-MHC mit self-Peptid getestet. Findet keinerlei MHC-Erkennung statt, so geht diese T-Zelle in den programmierten Zelltod, ein Vorgang, welcher auch als „death by neglect“ bekannt ist. Potentiell autoreaktive T-Zellklone, welche zu stark auf die körpereigenen Antigene reagieren, werden hingegen im Zuge der negativen Selektion entfernt. In die Peripherie gelangen somit nur positiv selektionierte, reife T-Zellen mit relativ schwach ausgeprägter Affinität zu self-Peptid-self-MHC Komplexen (Goldrath and Bevan, 1999b; Surh and Sprent, 2000). Die Deletion von selbstreaktiven T-Zellen im Thymus wird als zentrale Toleranz bezeichnet. Über den Transkriptionsfaktor AIRE werden im Thymus sogar zusätzlich Gene für Proteine zur Expression gebracht, welche sonst nur gewebsspezifisch in der Peripherie vorkommen (Anderson et al., 2005; Sprent and Surh, 2003b). Falls trotzdem eine autoreaktive Zelle in die Peripherie gelangt, greift die sog. periphere Toleranz. Klonale Deletion, Anergisierung oder einfach die „räumliche“ Trennung von autoreaktiver T-Zelle und erkennbarem Eigenantigen stehen dafür als Mechanismen zu Verfügung (Walker and Abbas, 2002).

Ein Molekül, das sowohl an der Induktion als auch an der Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz beteiligt ist, ist der sog. programmed cell death - 1 Rezeptor, kurz PD-1 (Okazaki and Honjo, 2006). Dieser 55kDa große Typ I Transmembranrezeptor wurde 1992 bei der Suche nach Apoptose-induzierenden Genen aus einem murinen T-Zellhybridom isoliert (Ishida et al., 1992). PD-1 ist ein negativer Regulator der T-Zellaktivierung und besitzt strukturelle Ähnlichkeit mit Mitgliedern der CD28 Familie (Okazaki and Honjo, 2006). Der inhibitorische Effekt von PD-1 zeigt sich bei Autoimmunität, Allergie, Transplantatabstoßung, Antitumorimmunität sowie chronischen Virusinfektionen (Okazaki and Honjo, 2006).

PD-1 knockout Mäuse entwickeln eine SLE-ähnliche (systemischer Lupus erythematoses) Autoimmunerkrankung bzw. dilative Kardiomyopathie, verursacht durch Autoantikörper gegen Troponin I, je nachdem, ob es sich um C57/BL6- oder BalbC-Mäuse handelt (Nishimura et al., 1999; Nishimura et al., 2001; Okazaki et al., 2003). SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) im humanen PD-1-Gen werden mit Autoimmunerkrankungen wie SLE oder Typ I Diabetes in Verbindung gebracht (Johansson et al., 2005; Nielsen et al., 2003).

PD-1 wird auf Thymozyten sowie auf reifen T- und B-Zellen nach Aktivierung exprimiert (Agata et al., 1996; Blank et al., 2003). Die zytoplasmatische Domäne von PD-1 besitzt sowohl ein ITIM- (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif) als auch ein ITSM-Motiv (immunoreceptor tyrosine-based switch motif). Die inhibitorische Funktion von PD-1 im Hinblick auf Zytokinproduktion und T-Zellexpansion wird über ITSM vermittelt, an welches das Adaptermolekül SHP-2 bindet. Nach einer Interaktion von PD-1 mit einem Liganden dephosphoryliert SHP-2 Effektormoleküle wie ZAP70 und CD3 ζ , welche bei T-Zellen in der Signalkaskade von PD-1 zu finden sind (Chemnitz et al., 2004; Okazaki and Honjo, 2007)

Es sind zwei Liganden für PD-1 bekannt, welche beide zur B7-Superfamilie gehören, nämlich PDL-1 (B7-H1) und PDL-2 (B7-DC) (Freeman et al., 2000; Latchman et al., 2001). PDL-1 wird auf vielen verschiedenen Zellen exprimiert, wie z.B. auf DCs, T- und B-Zellen, aber auch auf Endothelzellen der verschiedensten Organe sowie auf vielen Tumorzellen bzw. Tumorzelllinien. PDL-2 besitzt dagegen ein eingeschränkteres Expressionsmuster, das sich v.a. auf Antigen-präsentierende Zellen (APC) konzentriert (Greenwald et al., 2005). PDL-1 und PDL-2 werden nicht nur inhibitorische Effekte zugeschrieben (Brown et al., 2003; Freeman et al., 2000), sondern auch eine co-

stimulatorische Wirkungsweise, welche evtl. über einen anderen, bislang nicht identifizierten Rezeptor vermittelt wird (Wang et al., 2003).

4. Aufheben der Selbsttoleranz: Autoimmunerkrankung und Tumorthherapie

Die Toleranz gegenüber Eigenantigenen in der Peripherie wird jedoch gebrochen, wenn T-Zellen unter lymphopenen Bedingungen akut homöostatisch proliferieren. Dabei proliferieren v.a. T-Zellen mit einer relativ starken Affinität zu Komplexen aus self-MHC mit self-Peptid, so dass stets die Gefahr einer Autoimmunreaktion gegeben ist (Ernst et al., 1999; Prlic and Jameson, 2002; Surh and Sprent, 2000). Ein lymphopener Zustand führt zwar nicht zwangsläufig zur Autoimmunität, ist jedoch nach Krupica stets einer von mindestens zwei Faktoren, die in Kombination eine Autoimmunerkrankung auslösen (Krupica et al., 2006). Als Beispiel nennt diese Veröffentlichung die nonobese diabetic (NOD) Maus, in welcher die Insulin produzierenden β -Zellen durch aktivierte (LIP) $CD4^+$ T-Zellen zerstört werden. Ausgelöst wird diese Autoimmunerkrankung durch eine Überproduktion von IL-21, denn dieses Zytokin fördert zwar die Proliferation, nicht jedoch das Überleben der T-Zellen. Somit entstehen lymphopene Bedingungen, unter welchen LIP $CD4^+$ T-Zellen entstehen können (King et al., 2004; Krupica et al., 2006).

Auch die Depletion von regulatorischen T-Zellen (Treg) löst als „zweiter Faktor“ Autoimmunerkrankungen wie Colitis oder Gastritis aus. Arbeiten von Powrie zeigen, dass der Transfer von naiven $CD4^+ CD45RB^{high}$ T-Zellen in SCID Mäusen Colitis induzieren kann. Werden dagegen $CD4^+ CD45RB^{low}$ T-Zellen verwendet bzw. co-transferiert, so führt dies nicht zu Autoimmunität (Powrie et al., 1993). In späteren Experimenten wurde ermittelt, dass die Schlüsselpopulation der $CD4^+ CD45RB^{low}$ T-Zellen regulatorische T-Zellen ($CD4^+ CD25^+ FoxP3^+ CD45RB^{low}$) enthält. Werden SCID Mäusen $CD4^+$ T-Zellen (ohne Treg) injiziert, so kommt es zur Induktion einer Colitis. Bei Co-Transfer von Treg bzw. bei Gabe von Treg bis zu zehn Tagen nach Transfer der $CD4^+$ T-Zellen entsteht keine Autoimmunerkrankung (Sakaguchi et al., 1995). Ein lymphopener Zustand des Empfängertiers ist trotzdem „Faktor 1“ für die Colitis-Induktion. Die Depletion von Treg Zellen allein reicht bei einer Wildtypmaus nicht aus, um nach Transfer von $CD4^+$ T-Zellen eine Colitis zu induzieren (McHugh and Shevach, 2002). Als mögliche suppressive Wirkungsmechanismen für Treg wird die Produktion der beiden immunregulatorischen

Zytokine IL-10 und TGF- β diskutiert, aber auch die Expression des inhibitorisch wirkenden Moleküls CTLA-4 (Izcue et al., 2006).

Dass periphere T-Zellen im Rahmen der LIP die Toleranz gegenüber Eigenantigenen überwinden, wirkt sich jedoch positiv auf die Abstoßung von Tumoren aus. Die Lymphopenie ermöglicht eine Verstärkung der Immunantwort von T-Zellen, welche die meist nur schwach immunogenen Tumorantigene erkennen können. Im Gegensatz zu Tumorantigenen mit viraler Herkunft (Tumor-spezifischen Antigenen), leiten sich die meisten Tumorantigene von nicht mutierten Eigenantigenen (tumor-assoziierte Antigene, kurz TAA) ab. Diese sind nicht sehr immunogen, denn die meisten TAA werden sowohl von den Tumorzellen selbst als auch von normalem Gewebe exprimiert, werden daher während der Thymusreifung präsentiert, und unterliegen somit der zentralen Toleranz (McMahan and Slansky, 2007). Verschiedene therapeutische Ansätze versuchen, diese schwachen, jedoch vorhandenen Immunantworten zu verstärken, z.B. mittels Vakzinierung mit dem entsprechenden Tumorantigen oder aber mittels eines adoptiven T-Zelltransfers spezifischer T-Zellen (Dudley et al., 2005; Muranski et al., 2006). Frühe Studien von Hellstrom bzw. von Mule wiesen bereits darauf hin, dass LIP, ausgelöst durch Ganzkörperbestrahlung und anschließendem T-Zelltransfer, die Immunantwort gegen Tumorantigene verstärken kann. Unklar blieb damals jedoch, ob das Tumorstadium nicht schon allein durch die Bestrahlung beeinträchtigt wird (Hellstrom et al., 1978; Mule et al., 1979). 25 Jahre später zeigten Arbeiten von Dummer und von Hu im Mausmodell, dass durch T-Zelltransfer in einen lymphopenen Empfänger eine effizientere Antitumor-Immunantwort ausgelöst wird, als dies unter normalen Bedingungen möglich ist (Dummer et al., 2002). Und auch eine Vakzinierung mit Tumorantigen führt unter lymphopenen Bedingungen zur verbesserten Tumorstadium mittels transferierter spezifischer T-Zellen (Hu et al., 2002).

5. Regulation der LIP

Wie können periphere T-Zellen die Lymphopenie, also den „freien Raum“ wahrnehmen? Goldrath und Bevan diskutieren drei Möglichkeiten: Erstens durch verbesserten Zugang zu limitierenden Faktoren wie z.B. Zytokinen oder Liganden, um die alle im „Raum“ vorhandenen T-Zellen konkurrieren. Zweitens durch die Aufhebung einer gegenseitigen Hemmung zwischen den einzelnen T-Zellen über direkte Zellkontakte. Drittens ist auch

eine Zellpopulation vorstellbar, welche die T-Zelldichte überwacht und gegebenenfalls über proliferative Signale regulierend eingreift (Goldrath and Bevan, 1999b).

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass die aHP nicht nur von Kontakten zwischen TCR und MHC abhängig ist, sondern dass auch die beiden Interleukine 7 und 15 eine entscheidende Rolle als Mediatoren der aHP spielen (Fry and Mackall, 2001; Goldrath et al., 2002).

Bei der HP von naiven T-Zellen ist IL-7, ein Zytokin aus der „common γ chain“-Gruppe, das übergeordnete Zytokin: Es konnte gezeigt werden, dass IL-7 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gemeinsam mit Komplexen bestehend aus self-MHC und self-Peptid die verantwortlichen Faktoren für die aHP darstellen. Zwar fördern auch IL-4 bzw. IL-15, zwei weitere Zytokine der „common γ chain“-Gruppe, die aHP von naiven T-Zellen in *in vitro* Kulturen von sekundären Lymphorganen (Tan et al., 2001), aber *in vivo* konnte nur ein IL-7 knockout die aHP der transferierten T-Zellen vollständig verhindern (Schluns et al., 2000). Eine exogene Zugabe von IL-7 kann die homöostatische Proliferation von T-Zellen sowohl im *in vitro* als auch im *in vivo* System verstärken (Fry and Mackall, 2001; Tan et al., 2001).

IL-7 spielt generell eine wichtige Rolle in der Lymphozytenentwicklung und ist für die Homöostase naiver Lymphozyten in der Peripherie verantwortlich (Maraskovsky et al., 1996; Schluns et al., 2000). Der IL-7 Rezeptor (IL-7R) besteht aus der IL7R α -Kette (CD127) sowie der common γ chain, und dieser Rezeptor wird sowohl während der T-Zellreifung, als auch von peripheren T-Zellen exprimiert (Schluns et al., 2000; Tan et al., 2001). IL-7 wirkt wahrscheinlich - wie auch andere γ C- Zytokine - über eine Veränderung in der Expression von pro- bzw. anti-apoptotischen Molekülen, z.B. durch die verstärkte Expression des anti-apoptotisch wirkenden Moleküls Bcl-2 (Jameson, 2002; Pellegrini et al., 2004; Vella et al., 1997). Auch steht IL-7 mit Transkriptionsfaktoren wie „lung-Krüppel-like factor“ (LKLf) in Verbindung, einem Faktor, welcher für das Überleben von T-Zellen verantwortlich zu sein scheint (Schober et al., 1999). IL-7 kann als Master-Regulator der peripheren T-Zellhomöostase bezeichnet werden (Fry and Mackall, 2001), denn die Überexpression von IL-7 kann in einer IL-15 knockout Maus das Fehlen von IL-15 ausgleichen (Kieper et al., 2002).

IL-15 spielt zwar bei der Initiierung der aHP eine untergeordnete Rolle, kann sich aber verstärkend auf die Proliferation auswirken. In der Tat exprimieren T-Zellen den IL-15R erst nach Beginn der aHP (Jameson, 2002), wohingegen der IL-7R bereits auf den naiven

T-Zellen exprimiert wird. Während IL-7 v.a. für das Überleben und die aHP naiver T-Zellen wichtig ist, zeigt sich IL-15 zudem von entscheidender Bedeutung für die LIP von CD8⁺ Effektor/Memory T-Zellen. Auch das Überleben von CD8⁺ Effektor/Memory T-Zellen wird unter physiologischen Bedingungen von IL-15 unterstützt (Berard et al., 2003; Sprent and Surh, 2003a). Weit weniger ist über die Mediatoren der LIP von CD4⁺ Effektor/Memory T-Zellen bekannt: Ob TCR-MHC Kontakte oder bestimmte Zytokine sich eindeutig mit Überleben und LIP dieser relativ heterogenen Population in Verbindung bringen lassen, ist nach wie vor umstritten (Lee and Surh, 2005; Surh and Sprent, 2002), allerdings gibt es immer mehr Hinweise darauf, dass eine gewissen Abhängigkeit von IL-7 vorhanden ist (Boyman et al., 2007).

Mehrere Arbeiten verweisen im Zusammenhang mit der aHP von CD8⁺ Zellen auf eine IL-15-ähnliche Helferfunktion von IL-12, da dessen Rezeptor, der nicht zur Familie der γ C-Rezeptoren gehört, ebenfalls nicht auf naiven T-Zellen exprimiert wird (Jameson, 2002; Kieper et al., 2001). Die folgende Tabelle enthält eine Zusammenstellung aller bislang bekannten Mediatoren, die an der LIP von T-Zellen beteiligt sind.

Wie Tabelle 1 zeigt, benötigen die beiden peripheren T-Zellpools zwar unterschiedliche Faktoren bezüglich des Überlebens und der LIP, allerdings sind die Faktoren für das Überleben der T-Zellen unter normalen Bedingungen und die Faktoren, welche unter Lymphopenie eine Proliferation auslösen können, identisch (Boyman et al., 2007; Lee and Surh, 2005; Tan et al., 2002).

Tabelle 1

	<i>Überleben</i>	<i>LIP</i>
<i>naive CD8⁺</i>	MHC + self Peptide, IL-7	MHC + self Peptide, IL-7
<i>naive CD4⁺</i>	MHC + self Peptide, IL-7	MHC + self Peptide, IL-7
<i>Effektor/Memory CD8⁺</i>	IL-15	IL-15
<i>Effektor/Memory CD4⁺</i>	IL-7?	IL-7?

Tabelle 1: Vergleich der Faktoren, die für das Überleben bzw. für die LIP von naiven und Effektor/Memory T-Zellpopulationen benötigt werden

5.1 Modell 1: Wettstreit um limitierende Faktoren

Je größer das eingesetzte Inokulum naiver T-Zellen, umso schwächer die aHP. Dass die Anzahl der transferierten T-Zellen über das Ausmaß der aHP entscheiden kann, bedeutet auch, dass ein Co-Transfer von Zellen inhibierend wirken kann (Barthlott et al., 2003;

Stockinger et al., 2004a). Barthlott oder Dummer bezeichnen die Regulation der aHP sogar als „Nebeneffekt“ von Homöostase und Wettbewerb um limitierende Faktoren. Bystander T-Zellen müssen jedoch ebenfalls einen naiven Phänotyp besitzen, um in die gleichen Kompartimente einwandern zu können. Dummer nennt hier im Zusammenhang mit der HP naiver T-Zellen die sekundären Lymphorgane als Ort der Regulation durch Bystander T-Zellen. Zudem sind Bystander T-Zellen nur dann inhibierend, wenn sie selbst ein relativ hohes proliferatives Potential besitzen, unabhängig davon, ob es sich um polyklonale oder monoklonale T-Zellen handelt. Als hohes proliferatives Potential wird dabei eine starke Affinität zu Komplexen aus self-Peptid und MHC bezeichnet (Barthlott et al., 2003; Dummer et al., 2001).

In diesem ersten Modell werden naive $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen hinsichtlich der aHP gemeinsam reguliert (Tanchot et al., 1997). Obwohl das Verhältnis von $CD4^+$: $CD8^+$ T-Zellen unter normalen Bedingungen streng reguliert ist (Rocha et al., 1989), entscheidet nur die Gesamtzahl aller naiven Zellen des peripheren T-Zellpools, egal ob $CD8^+$, $CD4^+$ oder auch transgene T-Zellen, darüber, ob aHP stattfindet oder nicht. Folglich konnte auch gezeigt werden, dass ein Co-Transfer von $CD4^+$ T-Zellen die aHP von $CD8^+$ T-Zellen hemmen kann und umgekehrt (Ernst et al., 1999).

5.2 Modell 2: Wettstreit um klonale Nischen

Beim Modell des klonalen Wettbewerbs ist nicht die Anzahl der naiven T-Zellen entscheidend dafür, ob LIP stattfindet oder nicht, sondern vielmehr die Spezifität der einzelnen Zellen. So zeigen TCR transgene T-Zellen nur dann LIP, wenn sie in einen Empfänger gebracht werden, welcher entweder lymphopen ist, oder aber mit TCR transgenen T-Zellen besetzt ist, welche nicht dieselbe Spezifität besitzen wie die transplantierten T-Zellen selbst (Moses et al., 2003; Troy and Shen, 2003).

Jeder transgene T-Zellklon besitzt dabei seine eigene Affinität, d.h. verschiedene Klone binden unterschiedlich stark mit ihrem TCR an die Komplexe aus self-MHC und self-Peptid. Je stärker diese Affinität von TCR zu MHC, umso größer ist auch das Potential des jeweiligen transgenen Klons, unter lymphopenen Bedingungen zu proliferieren. Beispiele für T-Zellklone mit sehr schwach ausgeprägter Wettbewerbsfähigkeit um Komplexe aus self-MHC und self-Peptid sind die A18 und OT-II TCRtg T-Zellen, wohingegen OT-I, AND, 2C oder P14 TCRtg T-Zellen eine relativ hohe Avidität besitzen und eine ausgeprägte aHP zeigen (Chen et al., 2003; Stockinger et al., 2004b). Für polyklonale T-Zellen wurde bestimmt, dass nur etwa 30 Prozent der in einen lymphopenen Empfänger

transferierten Zellen überhaupt proliferieren. Es scheint also auch unter den polyklonalen Zellen Klone zu geben, die eine weniger starke Affinität zu Komplexen aus self-MHC und self-Peptid aufweisen (Ernst et al., 1999). Möglicherweise genügt bei der Selektion im Thymus eine geringere Affinität zum MHC-self-Peptid Komplex als bei der aHP in der Peripherie. Zellklone mit hoher Affinität proliferieren am stärksten, und drängen andere T-Zellen evtl. aus dem Wettbewerb (Surh and Sprent, 2000). Da T-Zellen mit einem ausgeprägten proliferativen Potential den Oberflächenmarker CD5 stark exprimieren, wurde ein hoher CD5 Level mit einer starken Affinität des TCR zu MHC-Komplexen in Verbindung gebracht. CD5 dient eigentlich der negativen Regulation bei der TCR-Signalübertragung (Azzam et al., 2001; Smith et al., 2001). In Kooperation mit der Höhe der TCR-Expression legt CD5 jedoch auch die Affinität einer T-Zelle zum Komplex von self-MHC-self-Peptid fest (Kassiotis et al., 2003): Je höher die CD5-Expression, umso besser sind also die einzelnen T-Zellen im Wettbewerb um homöostatische Signale (Ge et al., 2004; Kieper et al., 2004).

6. Die Memory-ähnliche T-Zelle

Nach Kontakt mit ihrem spezifischen Antigen verändert eine naive T-Zelle viele ihrer Oberflächenmarker. Aktivierte T-Zellen zeigen z.B. eine verstärkte Expression des frühen Aktivierungsmarkers CD69, und auch Zytokin-Rezeptoren wie CD25 (IL-2R α), CD122 (IL-2R β , Bestandteil des IL-2 Rezeptors und des IL-15 Rezeptors), und CD132 (γ C) werden hochreguliert. Zudem gibt es Veränderungen in den Adhäsionsmolekülen: Aktivierte T-Zellen verlieren CD62L und CCR7 und exprimieren CD44 verstärkt (Prlic and Jameson, 2002).

Immunantworten können nur dann korrekt ablaufen, wenn naive Lymphozyten aus der Blutbahn zu den sekundären Lymphorganen wie Lymphknoten und Peyer-Plaques gelangen können. Dort werden diese durch dendritische Zellen (DCs) aktiviert, und wandern als Effektorzellen anschließend zum entzündeten Gewebe. Um vom Blutstrom in periphere Lymphknoten einwandern zu können, müssen naive T-Zellen ein dreistufiges Programm absolvieren: „Rollen“, „Festhalten“ und „Anheften“. Die einzelnen Schritte dieses als „homing“ bezeichneten Prozesses werden nacheinander von Molekülen wie L-Selektin (=CD62L), Chemokinrezeptor CCR7 sowie Integrin LFA-1 (CD11a/CD18) bewerkstelligt, die auf Lymphozyten exprimiert werden, und zwar jeweils in

Zusammenarbeit mit den spezifischen Liganden auf der Endothelseite, also mit PNAd (peripheral node addressin) für L-Selektin, CCL21 für CCR7 und ICAM-1 für LFA-1. Im Lymphknoten angekommen, können die naiven T-Zellen Kontakt mit DCs aufnehmen und zu Effektorzellen reifen (Guarda et al., 2007; Warnock et al., 1998).

Innerhalb des Memory T-Zellpools unterscheidet Sallusto Effektor T-Zellen (TEM) von den sog. zentralen Memory T-Zellen (TCM), den langlebigen Gedächtniszellen des adaptiven Immunsystems. TEM wandern als Effektoren in entzündetes Gewebe und sind im Blut, in der Milz und im peripheren Gewebe zu finden, jedoch nicht in den Lymphknoten. TCM besitzen im Gegensatz zu TEM zwar keine sofort wirksamen Effektormechanismen wie zytotoxische Aktivität und Zytokinproduktion, aber sie können auf einen entsprechenden Stimulus hin schnell wieder zu wirksamen Effektoren werden. Bezüglich ihrer Adhäsionsmoleküle und Chemokinrezeptoren sind TCM einer naiven T-Zelle ähnlich, denn sie exprimieren CD62L und CCR7, und sind somit wieder in den Lymphknoten zu finden (Guarda et al., 2007; Miyasaka and Tanaka, 2004; Sallusto et al., 1999; Steeber et al., 1996).

Proliferieren naive T-Zellen unter lymphopenen Bedingungen, so verändern sich auch bei diesen Zellen verschiedene Oberflächenmarker. So zeigen aHP T-Zellen weder eine verstärkte Expression der frühen Aktivierungsmarker CD69, CD25 und CD71, noch verlieren sie die Expression für CD62L. Bezüglich ihrer Expression für CD44 und CD122 werden aHP T-Zellen aber mit jeder zusätzlichen Zellteilung einem Memory/Effektor Phänotyp immer ähnlicher. aHP T-Zellen entsprechen somit weder dem naiven Phänotyp, noch dem einer aktivierten Effektor/Memory T-Zelle. Man spricht hier vom „Memory-like phenotype“. Die Veränderung von naiven zu Memory-ähnlichen Eigenschaften ist nicht auf die Expression der Oberflächenmarker beschränkt, sondern trifft auch für die funktionellen Eigenschaften der aHP T-Zellen zu. Diese T-Zellen erkennen ihr spezifisches Antigen besser als naive T-Zellen und produzieren verstärkt IFN- γ nach Kontakt mit Fremdanitigen (Goldrath and Bevan, 1999a; Murali-Krishna and Ahmed, 2000).

Ein T-Zelldefizit im naiven T-Zellpool kann somit nicht durch die LIP von naiven T-Zellen ausgeglichen werden, da die proliferierenden Zellen fortan zum Memory T-Zellpool gerechnet werden müssen (Ge et al., 2002; Tan et al., 2002).

7. Ziel dieser Arbeit:

Die phänotypische und funktionelle Charakterisierung der HP T-Zelle

Kann man T-Zellen, die durch LIP entstehen, mit Effektor/Memory T-Zellen gleichsetzen (Chen et al., 2003; Oehen and Brduscha-Riem, 1999)? Murali-Krishna vergleicht Memory-like (LIP-Memory) Zellen mit naiven Zellen, die sich nur als Memory T-Zellen verkleiden, denn diese T-Zellen haben phänotypisch und funktionell Eigenschaften entwickelt, die einer konventionellen Effektor/Memory T-Zelle sehr ähnlich sind, allerdings völlig ohne Kontakt zu Fremdartigen (Murali-Krishna and Ahmed, 2000). Eine andere Studie zeigt, dass CD8⁺ LIP-Memory T-Zellen ebenso wie konventionelle CD8⁺ Memory T-Zellen mit der Hilfe von CD4⁺ T-Zellen wirksamen Schutz gegen Pathogene vermitteln können (Hamilton et al., 2006). Aber offenbar besitzt die LIP-Memory T-Zelle zusätzliche Eigenschaften, welche sie von der konventionellen Effektor/Memory T-Zelle abgrenzt, wie eben z.B. die Fähigkeit zur Tumorabstoßung.

Ziel dieser Arbeit war es daher, den Phänotyp dieser LIP-Memory T-Zellen näher zu charakterisieren. Folgende Fragen galt es dabei zu beantworten:

1. Gibt es einen stabilen Phänotyp für LIP-Memory T-Zellen? Wird dieser Phänotyp nach Initiierung unabhängig von lymphopenen Bedingungen, und bleibt dieser Phänotyp sogar nach Transplantation in eine nicht-lymphopene Umgebung stabil?
2. Können zusätzliche neue Marker für LIP-Memory T-Zellen identifiziert werden? Definieren ein oder mehrere Moleküle eindeutig den Phänotyp einer LIP-Memory T-Zelle?
3. Welche funktionelle Rolle spielen die zu identifizierenden Moleküle, d.h. welchen Einfluss haben Veränderungen dieser Moleküle auf die LIP naiver T-Zellen *in vitro* und *in vivo*?
4. Kann das Muster von Adhäsionsmolekülen und Chemokinrezeptoren Aufschluss über mögliche Bewegungsmuster und/oder Homingeigenschaften der LIP-Memory T-Zellen geben? In welchen Organen findet die Lymphopenie-induzierte Proliferation statt?

II. Methoden

1. Tumorzelllinien und Mausstämme

1.1 Verwendete Tumorzelllinien

Tumorzelllinie	Herkunft	Literatur
P815	H-2 ^d DBA/2 Maus	ATCC
HTR.c	H-2 ^d DBA/2 Maus	(Gajewski, 1996)
P815.B71	H-2 ^d DBA/2 Maus, transfiziert	(Gajewski, 1996)
MC 57-SIY induziert (K ^b)	H-2 ^b C57BL/6J Maus, transfiziert	(Spiotto et al., 2002)
EL 4	H-2 ^b C57BL/6N Maus	ATCC
M-MSV BALB/3T3	H-2 ^d BALB/c Maus	ATCC

P815/P815.B71/HTR.c

Mastozytom Zelllinie (P815), transfiziert mit B71 (P815.B71)

HTR.c :Subklon von P815, welcher *in vivo* solide Tumoren ausbildet

MC 57-SIY induziert

Fibrosarkom-Zelllinie, chemisch induziert

MC57-SIY induziert: transfiziert mit SIYRYGGL, induzierbar durch Tamoxifenzugabe,
= MC57-SIY induziert (Spiotto et al., 2002)

EL 4

T-Zell Lymphom, chemisch induziert

MMSV

Embryonale Fibroblasten Zelllinie

1.2 Verwendete Mausstämme

Die Tiere wurden in IVC (individually ventilated cages) - Käfigen gemäß der Richtlinien des Deutschen Tierschutzgesetzes gehalten. Das Trinkwasser wurde standardmäßig mit HCl konz. angesäuert (1ml / 1Liter Wasser). Um nosokomiale Infektionen zu vermeiden, wurde das Wasser zusätzlich mit Cotrim K (144mg Cotrimazol / 250ml H₂O) versetzt.

Die Zucht von RAG2^{-/-} Mäusen und P14 TCRtg RAG2^{-/-} Mäusen erfolgte unter SPF (special pathogen free) Bedingungen.

Alle Nachkommen der Mauszuchten aus IVC- und SPF- Haltung wurden mittels FACS- und PCR-Analysen genotypisiert.

<i>Maus</i>		<i>Erstbeschreibung</i>	<i>Herkunft</i>
C57BL/6	Kauf	-	Janvier, Le Genest-St-Isle, Frankreich
C57BL/6 62L ^{-/-}	Zucht, IVC	(Arbones et al., 1994)	The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA
C57BL/6 LTαβ ^{-/-}	SPF, Zucht	(Hehlhans et al., 2002)	zur Verfügung gestellt von Prof. Hehlhans, Uniklinikum Regensburg; K. Pfeffer, Universität Düsseldorf
C57BL/6 PD1tg	Zucht, IVC	(Keir et al., 2005)	zur Verfügung gestellt von A. Sharpe
RAG2 ^{-/-}	Zucht, SPF	-	Taconic, Germantown NY
P14 TCRtg RAG2 ^{-/-}	Zucht, SPF	-	Taconic, Germantown NY
P14 TCRtg RAG2 ^{-/-} 62L ^{-/-}	Zucht, IVC	-	Taconic, Germantown NY, Eigenzucht
2C TCRtg RAG2 ^{-/-}	Zucht, IVC	(Kranz et al., 1984), (Chen et al., 2003)	zur Verfügung gestellt von T. Gajewski; Eigenzucht
2C TCRtg RAG2 ^{-/-} 62L ^{-/-}	Zucht, IVC	-	The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA; Eigenzucht
2C TCRtg RAG2 ^{-/-} PD1 ^{-/-}	Zucht, IVC	(Nishimura et al., 1998)	Eigenzucht
2C TCRtg RAG2 ^{-/-} PD1tg	Zucht, IVC	-	Eigenzucht

RAG2^{-/-}:

RAG (Recombinase Activating Gene) - defiziente Mäuse mit C57BL/6 Background. Die beiden Gene RAG-1 und RAG-2 werden zur Rekombination des T- bzw. des B-Zellrezeptors benötigt. Kann aufgrund eines Defekts in einem der beiden Gene kein funktionsfähiger Rezeptor ausgebildet werden, so können keine reifen T- und B-Zellen entstehen. RAG2^{-/-} Mäuse besitzen somit in der Peripherie weder T- und B-Zellen und sind deshalb von Geburt an lymphopen (Mombaerts et al., 1992; Shinkai et al., 1992).

P14 TCRtg RAG2^{-/-}:

Zusätzlich zum RAG knockout tragen P14 TCRtg RAG2^{-/-} Mäuse die Information für einen transgenen T-Zellrezeptor (TCR). Dieser transgene CD8⁺ T-Zellklon erkennt über den TCR das H-2D^b bindende LCMV Glykoprotein (Peptid 33-41) (Pircher et al., 1987). Wie bei den RAG2^{-/-} Mäusen werden auch bei diesen Tieren im Verlauf der Thymusreifung alle T- und B-Zellen (bis auf die T-Zellen, welche den transgenen TCR P14 (CD8 restringiert) exprimieren) aufgrund des genetischen Defekts im RAG-2 Gen depletiert. In den P14 TCRtg RAG2^{-/-} Mäusen reifen deshalb nur T-Zellen heran, welche die Information für den transgenen TCR tragen, und P14 TCRtg RAG2^{-/-} Mäuse besitzen in der Peripherie somit ausschließlich CD8⁺ P14 TCRtg T-Zellen. Regulatorische T-Zellpopulationen wie z.B. die CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg fehlen in diesen Mäusen. Zudem kann der P14 T-Zellklon nicht mit den im 2C Tumormodell (vgl. 1.3.3) eingesetzten Peptiden p2Ca und SIY interagieren (Chen et al., 2003).

2C TCRtg RAG2^{-/-}:

Wie P14 TCRtg RAG2^{-/-} Mäuse tragen 2C TCRtg RAG2^{-/-} Mäuse zusätzlich zum RAG knockout die Information für einen transgenen TCR. Dieser transgene CD8⁺ T-Zellklon erkennt sowohl das artifizielle SIY (SIYRYYYGL) Peptid, welches auf syngenen MHC-I Komplex K^b präsentiert wird, als auch das ubiquitär vorkommende p2Ca (LSPFPFDL) Peptid der α -Ketoglutarat-Dehydrogenase zusammen mit dem zum Mausbackground C57BL/6 allogenem MHC-I L^d (Kranz et al., 1984; Sha et al., 1988). Auch bei der transgenen 2C Maus werden während der Thymusreifung alle T- und B-Zellen aufgrund des genetischen Defekts im RAG-2 Gen depletiert, so dass in 2C TCRtg RAG2^{-/-} Mäusen nur T-Zellen heranreifen können, welche die Information für den transgenen 2C TCR tragen.

1.3 Verwendete Mausmodelle

1.3.1 Mausmodell zur aHP von 2C TCRtg T-Zellen

Transfer naiver 2C TCRtg T-Zellen in chronisch lymphopene Empfängertiere wie RAG2^{-/-} Mäuse oder akut lymphopene Tiere wie subletal bestrahlte C57BL/6 Mäuse führt zur aHP der 2C T-Zellen. Gehemmt werden kann die aHP im nicht-lymphopenen Empfängertier, z.B. in einer transgenen P14 TCRtg RAG2^{-/-} Maus oder in einer Wildtyp C57BL/6 Maus.

1.3.2 Transfercolitis-Modell mit polyklonalen CD4⁺ T-Zellen

In Anlehnung an das Mausmodell zur aHP der 2C TCRtg T-Zellen wurde das Autoimmunmodell zur Colitisinduktion etabliert. Anstelle von 2C TCRtg T-Zellen werden in diesem Modell polyklonale CD4⁺ naive T-Zellen in RAG2^{-/-} transferiert. Durch das Brechen der Selbsttoleranz im Rahmen der LIP CD4⁺ naiver T-Zellen kommt es in der lymphopenen RAG2^{-/-} Maus zur Colitisinduktion (Powrie et al., 1993). Nach Transfer der polyklonalen CD4⁺ naiven T-Zellen in eine P14 TCRtg RAG2^{-/-} Maus wird die aHP der T-Zellen verhindert (nur BLP findet statt), und es tritt keine Colitis auf.

1.3.3 Das 2C-Tumormodell mit HTR.c (L^d)

Naive 2C TCRtg T-Zellen interagieren mit dem p2Ca Peptid, welches auf MHC-I L^d (MHCd) präsentiert werden kann. Die Empfängertiere (RAG2^{-/-} oder P14 TCRtg RAG2^{-/-}) besitzen jedoch einen C57BL/6 Background (MHCb), so dass die DC der Empfängertiere (MHCb) den 2C T-Zellen das p2Ca Peptid nicht präsentieren können. Somit können 2C T-Zellen den Tumor HTR.c (ein Subklon des Mastrozytoms P815, welcher solide Tumore formt) nur durch die direkte Interaktion des 2C TCR mit dem p2Ca Peptid auf der Tumorzelle erkennen.

In einer RAG2^{-/-} Maus können diese 2C TCRtg T-Zellen akut homöostatisch proliferieren und das Tumorstadium des HTR.c Tumors kontrollieren. In der nicht lymphopenen P14 TCRtg RAG2^{-/-} Maus können 2C TCRtg T-Zellen weder akut homöostatisch proliferieren noch das Tumorstadium kontrollieren.

1.3.4 Das 2C-Tumormodell mit MC 57- SIY induziert (K^b)

2C TCRtg T-Zellen können dagegen das SIY Peptid, welches auf MHCb exprimiert wird, in einer MHCb Maus (C57BL/6 Background) sowohl direkt als auch indirekt via DC Präsentation erkennen.

2. Methoden

2.1 in vivo Methoden

2.1.1 Bestrahlung von Mäusen

Um Wildtypmäuse lymphopen zu machen, wurden die Tiere zweimal im Abstand von ca. vier Stunden mit 600cGy bestrahlt. Der Zelltransfer erfolgte stets am Tag nach der Bestrahlung.

2.1.2 Transfer von T-Zellen in Mäuse

Vor dem Transfer in die Maus wurden T-Zellen dreimal mit sterilem PBS gewaschen, um alle Medienbestandteile zu entfernen. Für den adoptiven T-Zelltransfer wurden die Zellen in PBS resuspendiert, so dass die gewünschte Zellzahl pro Maus in 100µl PBS enthalten ist. Der Transfer wurde dann an mit Sevofluran (Abbott) anästhesierten Mäusen mittels retrobulbärer Injektion (0,4mm x 19 mm Kanüle, BD MicrolanceTM 3) durchgeführt.

2.1.3 Transfer von Tumorzellen in Mäuse

Auch Tumorzellen wurden vor Injektion in eine Maus dreimal mit PBS gewaschen. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden die Tumorzelllinien HTR.C und MC57.SIY verwendet, welche subkutan in die linke Flanke der Mäuse gespritzt wurden. Jede Maus erhielt dabei 1×10^6 Tumorzellen in 100µl PBS. Die Injektion erfolgte mit einer (0,9mm x 40 mm Kanüle, BD MicrolanceTM3).

2.1.4 Kontrolle von Tumorverlauf und Gewicht

Die Tumorgröße wurde zweimal pro Woche kontrolliert, wobei stets der längste und der dazu im 90° Winkel gelegene Durchmesser bestimmt wurden. Daraus wurde jeweils ein Durchschnittswert bestimmt. Zwei bis fünf Mäuse wurden pro Gruppe eingesetzt. Sowohl die Durchschnittswerte als auch die Standardabweichungen wurden mit Hilfe des MiniTab Programms ermittelt.

Bei den Colitisexperimenten wurde das Gewicht der Mäuse zweimal pro Woche kontrolliert. Auch hier wurden Durchschnittswerte und Standardabweichungen mit Hilfe von MiniTab ermittelt, und die Ergebnisse wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben.

2.1.5 Organentnahme

Nachdem die Tiere mittels CO₂-Narkose getötet worden waren, wurden die jeweiligen Organe entnommen. Wurde Blut benötigt, so wurde dies durch Punktion des Herzmuskels gewonnen. Für immunhistochemische Untersuchungen wurden die Organe direkt in Formalin oder flüssigen Stickstoff tiefgefroren. Für die Isolierung bzw. für die FACS-Analyse von T-Zellen aus Milz und/oder Lymphknoten wurden diese Organe bis zur weiteren Verarbeitung in gekühltem Medium aufbewahrt.

Zur Gewinnung des Knochenmarks wurden Femur und Tibia der Hinterläufe einer Maus herauspräpariert. Die Enden der Knochen wurden abgeschnitten, so dass das freigelegte Knochenmark mit Hilfe einer 10ml Spritze und einer (0,6mm x 30mm Kanüle, BD MicrolanceTM 3) ausgespült werden konnte. Das Knochenmark wurde in einer Petrischale aufgefangen und zur Zellsuspension vereinzelt.

2.2 in vitro Methoden

2.2.1 Allgemeine Methoden

Alle Arbeiten mit murinen Tumorzelllinien und Primärkulturen sowie alle funktionellen Analysen wurden stets unter sterilen Bedingungen durchgeführt (LaminaAir HB2448, Heraeus).

Die Inkubation von Tumorzelllinien, Primärkulturen und funktionellen Analysen erfolgte in einem Brutschrank (Heraeus 6000) bei einer Luftfeuchtigkeit von 95%, einem CO₂-Gehalt von 7,5 % sowie bei einer konstanten Temperatur von 37°C.

2.2.1.1 Zentrifugation

Soweit nicht anders angegeben wurden alle Zentrifugationsschritte sowohl für Tumorzellen als auch für murine Primärzellen bei 4°C für 5 Minuten bei 330 x g durchgeführt.

2.2.1.2 Ermittlung der Lebendzellzahl mittels Trypanblau-Färbung

Die Zellsuspensionen von Tumorzellen bzw. Immunzellen wurden 1 : 1 mit einer Trypanblaulösung (Trypan Blue Stain 0,4%, Gibco, Invitrogen) verdünnt und in einer Neubauer-Zählkammer mit Hilfe eines Mikroskops (Leitz DMRB, Leica) ausgezählt. Da

der blaue Farbstoff nur von Zellen mit fehlender Membranintegrität aufgenommen wird, erscheinen tote Zellen blau, lebende Zellen bleiben dagegen ungefärbt.

Berechnet wird die Zellzahl nach folgender Formel:

$$\frac{\text{Anzahl der Zellen} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 0,01}{\text{Anzahl der Großquadrate}} = \text{Zellzahl / ml}$$

2.2.2 Zellkultur

2.2.2.1 Splitten adhärent und nicht-adhärent wachsender Tumorzelllinien

Alle Tumorzelllinien wurden ca. zweimal die Woche bei einer Konfluenz von etwa 90 Prozent abgeerntet. Dazu wurde zunächst das Medium der adhärent wachsenden Kultur entfernt und der Zellrasen einmal mit PBS gespült. Das Ablösen der Tumorzellen erfolgte durch eine ca. dreiminütige Inkubation bei RT mit 3ml 1 x Trypsin/EDTA (10fach, PAN Biotech) in PBS. Die Suspension aus abgelösten Zellen wurde mit 10ml Medium verdünnt und abzentrifugiert. Eine neue Zellkulturflasche wurde schließlich - je nach Bedarf und Zelllinie - mit 1/5 bis 1/20 der abgeernteten Zellen angeimpft.

Auch nicht-adhärenz wachsende Kulturen wurden zweimal pro Woche abzentrifugiert und mit Medium gewaschen. Die neue Kultur wurde ebenfalls - je nach Bedarf und Zelllinie - mit 1/5 bis 1/20 der abgeernteten Suspensionszellen angeimpft.

2.2.2.2 Mycoplasmentest

In regelmäßigen Abständen erfolgte eine Überprüfung der verwendeten Tumorzelllinien auf Mycoplasmen mit Hilfe des VenorGeM-Tests (Minerva Biolabs).

2.2.2.3 Auftauen und Einfrieren von Tumorzelllinien

Zum Auftauen wurden in flüssigem Stickstoff eingefrorene Zellaliquots ($1-5 \times 10^6$ Zellen/ml) in 10ml Medium überführt. Nach Zentrifugation und einem Waschschrift mit Medium wurden die Zellen in eine Zellkulturflasche mit Medium überführt.

Aliquots neu aufgetauter Tumorzellen wurden nach zwei bis drei Passagen erneut weggefroren. Dazu wurden nach dem Abernteten Zellaliquots mit $1-5 \times 10^6$ Zellen in 1ml Einfriermedium zunächst bei -80°C eingefroren und nach zwei Tagen dauerhaft in flüssigem Stickstoff eingelagert.

2.2.3 Isolierung muriner T-Zellen

2.2.3.1 Gewinnung naiver T-Zellen aus murinen Milzen

Für die Aufreinigung von T-Zellen aus der Milz wurde das entnommene Organ zunächst steril über ein Zellsieb (Cell Strainer 100µm, BD Falcon) in einer Petrischale (Easy Grip Petri Dish, Falcon) zerrieben, um eine Einzelzellsuspension herzustellen. Die Suspension wurde erneut über ein Zellsieb getropft, um Gewebeteile zu entfernen. Nach einem Waschschrift wurden die Splenozyten in dem jeweils benötigten Puffer zur Zellaufreinigung aufgenommen. Sowohl naive polyklonale als auch monoklonale T-Zellen wurden mit Hilfe der negativen Zellseparation isoliert. Im Rahmen dieser Arbeit kamen zwei verschiedene Separationssysteme zur negativen Zellisolierung zum Einsatz, das Dynal-System und das SpinSep-System.

2.2.3.2 Dynal-Kit (Dynal Mouse CD4⁺ bzw. CD8⁺ Negative Isolation Kit, Invitrogen Dynal): Magnetische Zellseparation

Die Separationsmethode von Dynal beruht auf der Bindung von magnetischen Polystyrol Beads (beschichtet mit polyklonalen sheep-anti-rat IgG Antikörpern) an Zellen, welche zuvor mit einem Cocktail von Ratte-Antikörpern markiert wurden. Diese Antikörper binden alle Zellpopulationen, welche entfernt werden sollen, und nur die zu isolierende Zellfraktion bleibt unmarkiert (= Prinzip der negativen Zellisolierung).

Zunächst wurden die Splenozyten abzentrifugiert und in 1ml PBS + 10% BSA (Albumin Fraktion V, Roth) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mit dem Cocktail von Ratte-Antikörpern (150µl/Milz) sowie 200µl FCS/Milz (zum Abblocken unspezifischer Bindungen) versetzt und bei 4°C inkubiert. Nach 20 Minuten wurden nicht gebundene Antikörper durch Waschen der Zellsuspension mit PBS + 0,1% BSA entfernt, und das Pellet wurde in 5ml PBS + 0,1% BSA/Milz resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde mit magnetischen Beads (1,5ml/Milz) versetzt, welche zuvor zweimal mit PBS + 0,1% BSA gewaschen wurden. Nach einer Inkubation von 15 Minuten auf dem Überkopffrotator (MACSmix, Miltenyi Biotec) wurde die Suspension in einen Handmagneten überführt. Durch die Exposition im magnetischen Feld werden die an magnetische beads gebundenen Zellen an der Röhrchenwand festgehalten, so dass sich nur noch die erwünschten, unmarkierten Zellen in der Suspension befinden. Diese Suspension wurde in ein neues Röhrchen überführt und erneut für 2 Minuten im Magneten inkubiert, um auch noch letzte markierte Zellen aus der Suspension zu entfernen. Schließlich wurden die isolierten

T-Zellen zentrifugiert, mit Medium resuspendiert, ausgezählt und für die FACS-Analyse der Aufreinigung (vgl. 2.2.5.2) vorbereitet.

2.2.3.3 SpinSep-Kit (SpinSep Negative Isolation Kit für CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen (CellSystems): Zellseparation über die Dichte

Das System zur Zellseparation von SpinSep (CellSystems) trennt markierte und nicht markierte T-Zellen aufgrund der unterschiedlichen Dichte dieser Populationen. Um diese unterschiedlichen Dichten zu erreichen, wurden auch in diesem System zunächst alle unerwünschten Zellen mit einem Antikörpercocktail (15µl/Milz, resuspendiert in 2ml SpinSep Puffer/Milz) markiert. Nach 15 Minuten Inkubation bei 4°C und dem Entfernen der überschüssigen Antikörper durch Waschen mit dem SpinSep Puffer erfolgte die Zugabe der sog. SpinSep Dense Particles (500µl/Milz, resuspendiert in 2ml SpinSep Puffer/Milz). Diese binden dank ihrer Beschichtung mit Antikörpern gegen den Fc-Teil des Antikörpercocktails an alle zu depletierenden Zellen. Nach 20-minütiger Inkubation auf Eis erfolgte die Auftrennung dieser markierten („schweren“) und nicht-markierten („leichteren“) Zellen in einem speziellen Dichtegradienten: Dazu wurden zunächst 5 ml des sog. SpinSep Density Mediums in einem 15 ml Röhrchen (Corning Costar) vorgelegt, welches mit der Suspension aus Zellen und Partikeln vorsichtig überschichtet wurde, so dass zwei getrennte Phasen entstanden. Alle „schweren“ Zellen finden sich nach Zentrifugation (10 Min, 770 x g, ohne Bremse) im Pellet wieder, wohingegen sich die unmarkierten Zellen in der Interphase zwischen Density Medium und überschichtetem Zellkulturmedium ansammeln. Diese Phase wurde abgezogen und mit SpinSep Puffer gewaschen, um das restliche Density Medium zu entfernen. Abschließend wurden die Zellen in Zellkulturmedium aufgenommen, ausgezählt und für die FACS-Analyse der Aufreinigung vorbereitet.

2.2.3.4 Gewinnung von LIP T-Zellen aus murinen Milzen und Lymphknoten

Polyklonale bzw. monoklonale T-Zellen, welche in RAG2^{-/-} Mäusen unter lymphopenen Bedingungen proliferiert haben, wurden mittels Dynal Kit zur Negativen Isolation (Invitrogen Dynal) isoliert. Allerdings wurden die Mengen an pro Milz eingesetzten Antikörpern und Beads jeweils um ein Drittel reduziert, da es sich bei diesen Milzen/Lymphknoten um Lymphorgane handelt, die deutlich weniger Zellen beherbergen als das bei einer Wildtypmaus der Fall ist. Zudem wurden für die Aufreinigung der LIP T-Zellen meist Milz und Lymphknoten zusammen zu einer Einzelzellsuspension verarbeitet.

2.2.3.5 Aufreinigung von $CD4^+$ $CD25^+$ regulatorischen T-Zellen

Die Aufreinigung der im Colitismodell eingesetzten regulatorischen T-Zellen erfolgte aus den Milzen von C57BL/6-Mäusen in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Hoffmann/Edinger nach etabliertem Protokoll (Hoffmann et al., 2002).

2.2.4 *in vitro* Stimulation naiver T-Zellen und Restimulation

2.2.4.1 Stimulation von 2C TCRtg T-Zellen mit dem Tumor P815.B71

2C TCRtg (2CPD1^{-/-}, 2C PD1tg, 2C 62L^{-/-}) T-Zellen können *in vitro* mit P815.B71 stimuliert werden. In einer 24-well Platte (Tissue Culture Treated, Polystyrene, Corning Costar) wurden dazu pro well 100.000 2C T-Zellen mit 500.000 Tumorzellen in 2,5 ml Medium co-inkubiert. Um zu verhindern, dass die Tumorzellen die T-Zellen überwachsen, wurden jeweils 3×10^7 P815.B71 Tumorzellen in 10ml Medium mit MitomycinC (2mg/ml Medium, Medac) für 90 Minuten im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Tumorzellen insgesamt dreimal mit Medium gewaschen, wobei nach dem zweiten Waschschritt die Zellen für zehn Minuten im Medium ruhten, um überschüssiges MitomycinC abgeben zu können.

Nach vier Tagen wurden die Zellen abgeerntet, zentrifugiert und in Medium resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde auf Ficoll (Pancoll human, PAN Biotec) geschichtet, so dass zwei getrennt Phasen entstanden. Nach einer entsprechenden Zentrifugation (20 min bei RT, 525 x g, ohne Bremse) befinden sich lebende T-Zellen in der Interphase, tote Zellen und Tumorzellen dagegen im Pellet.

Auch die Restimulation wurde im Verhältnis 1: 5 T-Zellen zu Tumorzellen angesetzt.

2.2.4.2 Stimulation polyklonaler T-Zellen mit dem T-Zell-Expander Kit

Aufgereinigte $CD4^+$ bzw. $CD8^+$ T-Zellen wurden mit Dynabeads (Mouse CD3/CD28, T Cell Expander Kit, Invitrogen Dynal) im Verhältnis 1:1 sowie rMu IL-2 (10U/ml Medium, PromoKine) polyklonal stimuliert.

Die benötigte Menge an Dynabeads wurde zunächst mit PBS + 0,1% BSA im Dynal Handmagneten gewaschen. Pro well einer 24-well Platte (Corning Costar) wurden dann 750.000 Dynabeads mit 750.000 T-Zellen in 1,5ml Medium mit 10U IL-2/ml co-inkubiert. $CD8^+$ T-Zellen wurden nach drei bis vier Tagen restimuliert, $CD4^+$ T-Zellen nach vier bis fünf Tagen. Nach Abernten der Platte wurden die Beads mit Hilfe des Handmagneten entfernt. Zusätzlich wurden über einen Ficollschritt lebende von toten Zellen getrennt. Die

Restimulation der lebenden Zellen erfolgte dann wieder im Verhältnis 1 : 1 mit Dynabeads, jedoch nur noch mit 2U IL-2/ml Medium.

2.2.5 Analyse von Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie

2.2.5.1 Prinzip des FACS

Alle durchflusszytometrischen Messungen wurden an einem FACS-Calibur (BD) mit dem Cellquest-Programm durchgeführt. Die Auswertungen der aufgezeichneten FACS-Daten erfolgte mit Hilfe des Flowjo-Programms (Treestar, San Carlos, CA).

Die Messeinstellungen wurden vor jeder Messung mit ungefärbten Proben, Einzelfärbungen bzw. Isotypkontrollen überprüft und gegebenenfalls korrigiert.

Im FACS (fluorescence-activated cell sorter) können Zellen charakterisiert werden. Das Vorwärtsstreulicht („forward-scatter“, FSC) liefert Informationen über die Größe der Zellen, das Seitwärtsstreulicht („side-scatter“, SSC) dagegen gibt Auskunft über die Granularität der Zelle. Im FACS Calibur können zusätzlich zu diesen beiden Eigenschaften mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper noch vier weitere Parameter untersucht werden. Dazu verfügt das FACS Calibur über zwei Laser (Argon- und UV-Laser), welche die Fluoreszenzfarbstoffe anregen können. Die Emission der Farbstoffe kann in vier Kanälen gemessen werden. Als Farbstoffkonjugate wurden FITC (Fluoroisothiocyanat), PE (Phycoerythrin), PercP (Peridin-Chlorophyll-Protein) und APC (Allophycocyanin) eingesetzt.

2.2.5.2 Antikörperfärbung von Oberflächenmarkern

Für die FACS-Färbungen wurden 96-well Spitzbodenplatten (Mikrotiterplatten, V-Bottom, Greiner) verwendet. Je $0,5 \times 10^6$ bis 1×10^6 Zellen wurden pro well für eine Färbung eingesetzt.

Bevor die gegen Oberflächenmoleküle gerichteten Antikörper zugegeben wurden, wurden die Zellen zunächst einmal mit FACS-Puffer gewaschen. Unspezifische Bindungen wurden mit 15µl 2.4G2 (anti-Fc-Rezeptor Antikörper) abgesättigt. Anschließend wurden 10µl eines direkt konjugierten Antikörpers zupipettiert. Die Inkubation erfolgte bei 4°C im Dunkeln für 15 Minuten. Anschließend wurden überschüssige Antikörper mittels eines Waschschruttes mit FACS-Puffer entfernt. Die gefärbten Proben wurden schließlich für die Messung am FACS in kleine Röhrchen (1,2 ml Polypropylene Cluster Tubes, Costar Corning) überführt. Die gefärbten Proben sollten innerhalb von zwei Stunden gemessen werden, sonst empfiehlt es sich, die Färbung mit 1%igem Formaldehyd in PBS zu fixieren.

Dies verhindert ein Ablösen der gebundenen Antikörper. Die Fixierung ermöglicht eine Messung innerhalb von 48 Stunden.

Gleichzeitig sollten nicht mehr als zwei verschiedene Antikörper gefärbt werden. Nach einem Waschschrift kann eine Probe allerdings erneut mit bis zu zwei zusätzlichen Antikörpern markiert werden, so dass alle vier Farbkanäle besetzt sind.

Folgende Antikörper wurden verwendet:

	Isotyp	Klon	Herkunft	Fluorochrom	Hersteller	
anti-CD3	rIgG _{2a} , κ	17 A2	Rat	PE	BD Pharmingen	1:20
anti-CD3	rIgG1*, κ	145-2C11	Rat	F, APC	BD Pharmingen	1:80
anti-CD4	rIgG _{2a} , κ	RM4-5	Rat	F, PE, APC	BD Pharmingen	1:80
anti-CD5	rIgG _{2a} , κ	53-7.3	Rat	PE	BD Pharmingen	1:80
anti-CD8	rIgG _{2a} , κ	53-6.7	Rat	F, PE, PercP, APC	BD Pharmingen	1:80
anti-CD25	rIgG ₁ , λ	PC61	Rat	PE	BD Pharmingen	1:50
anti-CD44	rIgG _{2a} , κ	IM7	Rat	PE	BD Pharmingen	1:80
anti-CD45RB	rIgG _{2a} , κ	16A	Rat	PE	BD Pharmingen	1:80
anti-CD62L	rIgG _{2a} , κ	MEL-14	Rat	PE	BD Pharmingen	1:80
anti-CD69	hIgG1*, λ	H1.2F3	Hamster	PE	BD Pharmingen	1:80
anti-CD122	rIgG _{2b} , κ	TM-β1	Rat	PE	BD Pharmingen	1:80
anti-CD127	rIgG _{2a} , κ	A7R34	Rat	PE	ebioscience	1:80
anti-CCR7	rIgG _{2a} , κ	4B12	Rat	PE	ebioscience	1:10
anti-PD-1	hIgG	J43	Hamster	affin. purified, PE	ebioscience	1:50
anti-PDL-1	rIgG _{2a} , λ	MIH5	Rat	PE	ebioscience	1:80
anti-Ly6C	IgG M, κ	AL-21	Rat	F	BD Pharmingen	1:80
anti-FoxP3	rIgG _{2a} , κ	FJK-16s	Rat	PE	ebioscience	
anti-Vα2	rIgG _{2a} , λ	B20.1	Rat	F, PE	BD Pharmingen	1:80
Isotyp	rIgG _{2a} , κ	R35-95	Rat	F, PE, APC	BD Pharmingen	
anti-CD3	hIgG1*, κ	145-2C11	Hamster	functional grade	ebioscience	-
anti-CD28	hIgG	37.51	Hamster	functional grade	ebioscience	-
Streptavidin	-	-	-	PE, PerCP	BD Pharmingen	1:50
anti-1B2	-	-	Mouse	F, Al. Fluor 647	(Kranz et al., 1984)	1:50
2.4G2	-	-	-	-	ATCC	-

Wurde statt dieser direkten Antikörperfärbung eine indirekte Färbung durchgeführt, so musste in einem ersten Schritt der unmarkierte (oder biotinylierte) Antikörper zur Probe pipettiert werden. Nach Inkubation und Waschen mit FACS-Puffer konnte dann ein

sekundärer Antikörper zugegeben werden, welcher den unmarkierten Antikörper über die spezifische Struktur des Fc-Teils erkennen kann, bzw. mit einem Fluorochrom konjugiertes Streptavidin, welches Biotin bindet.

2.2.5.3 Labeling von 1B2

Ein spezifischer Antikörper gegen den 2C TCR ist nicht käuflich zu erwerben. Dieser Antikörper wurde in unserem Labor aus dem Überstand des Hybridoms 1B2 mit Hilfe des ImmunoPure (G) Kit (Pierce) aufgereinigt.

Obwohl eine indirekte Färbung zwar schwache Signale durch den nachfolgenden Sekundärantikörper verstärken kann, ist doch stets die Gefahr einer unspezifischen Bindung des sekundären Antikörpers gegeben. Deshalb wurde der Antikörper gegen den 2C TCR mit Hilfe des Alexa Fluor 647 Monoclonal Antibody Labeling Kits (Invitrogen, nach Angaben des Herstellers) direkt markiert.

2.2.5.4 TCR V β -Analyse

Die Analyse des V β Repertoires einer T-Zellpopulation wurde nach Anleitung mit dem Mouse V β TCR Screening Panel (BD Pharmingen) durchgeführt. Gefärbt wurde dabei mit 15 FITC-konjugierten Antikörpern gegen verschiedene V β Epitope.

2.2.5.5 Intrazelluläre FACS-Färbung

Handelt es sich bei den zu färbenden Molekülen nicht um Oberflächenmarker, so ist eine Intrazellulärfärbung nötig. Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese Färbart für die Moleküle CD3, PD-1 und FoxP3 durchgeführt. Nach der Färbung der Oberflächenmarker erfolgte nach einem weiteren Waschschrift die Fixierung dieser Färbung für zehn Minuten mit 0,25% Formaldehyd in PBS. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen zweimal mit Saponin-Puffer gewaschen, um die Zellen zu permeabilisieren. Die Zugabe der Antikörper erfolgte ebenfalls in Saponinpuffer. Nach 20-minütiger Inkubation im Dunkeln wurde erneut zweimal mit Saponin- und anschließend mit FACS-Puffer gewaschen. Die Färbung wurde mit 2% Formaldehyd in PBS fixiert.

Für die Färbung von FoxP3 wurde der Cytofix/Cytoperm Kit (BD Pharmingen) verwendet.

2.2.5.6 CFSE Markierung

Die Markierung von T-Zellen mit Carboxyfluorescein-Diazetat-Succinimidyl-ester (CFSE, CFDA SE) wurde mit dem Vybrant CFDA SE cell Tracer Kit (Molecular Probes) durchgeführt. Der Farbstoff CFSE ist im FACS im FITC-Kanal zu detektieren. Bei der Färbung reichert sich CFSE im Zytoplasma der Zellen an und wird bei jeder Zellteilung zu gleiche Teilen auf die beiden Tochterzellen verteilt.

Aufgereinigte T-Zellen wurden zunächst dreimal mit PBS gewaschen und für die Markierung mit CFSE auf (bis zu) $1,5 \times 10^7$ Zellen /ml PBS eingestellt. Die 10mM Stocklösung wurde nach Anleitung angesetzt. Ein tiefgefrorenes Aliquot von 10µl CFSE-Stocklösung wurde mit 1ml PBS verdünnt, und von dieser 100µM CFSE Lösung wurden für polyklonale CD8⁺ T-Zellen (und für 2C TCRtg T-Zellen) pro ml Zellsuspension 8µl CFSE verwendet (= 0,8µM), für polyklonale CD4⁺ T-Zellen nur 6µl CFSE (= 0,6µM). Nach kurzem Vortexen erfolgte die Inkubation bei 21°C für sieben Minuten. Abgestoppt wurde die CFSE-Aufnahme in die Zellen durch Zugabe von 5ml eiskaltem FCS. Die gelblich erscheinenden Zellen wurden anschließend dreimal mit Medium gewaschen, um letzte Reste des CFSE zu entfernen.

2.2.5.7 Lebend-tot-Färbung mit Propidium-Jodid (PI)

Propidium Jodid (Sigma-Aldrich) ist ein DNA-markierender Farbstoff und kennzeichnet tote Zellen. PI gelangt nur dann ins Zellinnere und interkaliert mit der DNA, wenn die Zellmembran zerstört ist. Dieser Farbstoff kann im gleichen Kanal wie PercP detektiert werden und wird häufig benutzt, um in einem ersten Schritt tote von lebenden Zellen zu unterscheiden. PI wird erst kurz vor der FACS-Analyse zugesetzt (1µl / 100µl Zellsuspension), eine Inkubation ist nicht erforderlich.

Eine Lebend-tot-Färbung mittels Propidium Jodid kann nach einer Fixierung der Proben mit Formaldehyd nicht mehr vorgenommen werden, denn die Fixierung macht die Zellmembran durchlässig für PI.

2.2.5.8 Apoptose-Nachweis mittels AnnexinV und PI

Die Translokation von Phosphatidylserin von der Innenseite der Zellmembran auf deren Außenseite ist ein frühes Ereignis nach Apoptoseinduktion. Durch das spezifische Molekül AnnexinV kann die Verlagerung des Phosphatidylserins durchflusszytometrisch sichtbar gemacht werden (Vermes et al., 1995). AnnexinV bindet jedoch auch an nekrotische bzw. aktivierte Zellen (Fischer et al., 2006), so dass stets eine Doppelfärbung von PI und

AnnexinV nötig ist, um doppelt-negative (lebende) Zellen von doppelt-positiven (toten) Zellen von AnnexinV-positiven, PI-negativen und somit apoptotischen Zellen unterscheiden zu können.

Nach Färbung der jeweiligen Oberflächemarker wurden die Zellen abzentrifugiert, und nach vollständigem Entfernen des FACS-Puffers in 100µl Bindungspuffer (10fach, BD Pharmingen) aufgenommen. Die einzelnen Proben wurden mit 5µl AnnexinV-PE (BD Pharmingen) für zehn Minuten auf Eis inkubiert. Kurz vor der Messung im FACS wurde 1µl PI-Lösung zupipettiert.

2.2.5.9 Standard-Analysen

2.2.5.9.1 Analyse der T-Zellaufreinigung

Jeder Aufreinigung von T-Zellen folgte eine abschließende FACS-Kontrolle. Analysiert wurden stets Reinheit der Zellpopulation und Aktivierungsstatus der Zellen.

Abbildung I zeigt eine Standard-FACS-Analyse für naive 2C TRCtg T- Zellen. Dabei wurde zunächst ein Gate um die Lymphozytenpopulation gesetzt, um tote Zellen auszuschließen. Im nächsten Schritt erfolgte die Identifizierung der doppelt positiven anti-1B2-FITC und anti-CD8-APC positiven Zellen, um die Reinheit der aufgereinigten und mit Trypanblau ausgezählten 2C T-Zellen bestimmen zu können (Abb. I A).

Zudem wurden die 2C T-Zellen vor Einsatz in einem Experiment routinemäßig auf ihren jeweiligen Aktivierungsstatus untersucht. Naive T-Zellen zeigen dabei wie in Abbildung I B dargestellt eine starke CD62L- und eine schwache CD44-Expression.

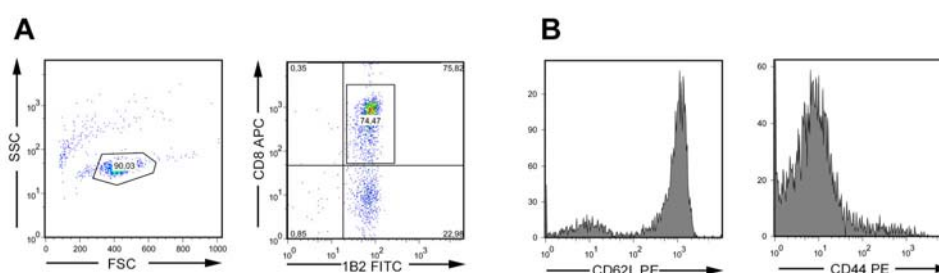


Abbildung I: Standard-FACS-Analyse von aufgereinigten, naiven 2C T-Zellen

A) Bestimmung der Reinheit für anti-1B2-FITC und anti-CD8-APC doppelt-positive 2C T-Zellen

B) Analyse des Aktivierungszustandes der naiven 2C T-Zellen über CD62L und CD44

2.2.5.9.2 Analyse eines CFSE-Experiments

Die Detektion von CFSE markierten T-Zellen erfolgte über eine FACS-Analyse. Dazu wurden zunächst alle zu analysierenden Organe entnommen (stets Milz und Lymphknoten, aber auch Thymus, Knochenmark, Leber und Lunge). Alle Organe wurden über ein Zellsieb (Cell Strainer 100 μm , BD Falcon) zerrieben. Um Erythrozyten zu entfernen, wurde nach einem Waschschriff jedes Zellpellett mit 3ml ACK-Lysepuffer resuspendiert und für fünf Minuten bei RT inkubiert. Nach einem Waschschriff mit Medium wurden die Zellen für die FACS-Analyse vorbereitet und wie unter 2.2.5.2 beschrieben für die angegebenen Oberflächenmarker gefärbt. Dabei konnten jedoch nur die Kanäle für PE und APC belegt werden, da CFSE bereits den FITC-Kanal besetzt, und zusätzlich kurz vor der Messung 1 μl PI / 100 μl Zellsuspension zugesetzt wurde, um die toten Zellen bei der Analyse ausschließen zu können.

Am Beispiel der aHP von CFSE-markierten 2C TCRtg Zellen, die in einer RAG2^{-/-} Maus aHP zeigten, ist hier das Schema der einzelnen Gates dargestellt (Abbildung II). Zunächst wurden die lebenden, PI-negativen Zellen identifiziert, und im nächsten Schritt die anti-1B2-APC positiven T-Zellen. Diese wurden schließlich in einem Histogramm dargestellt, welches Aufschluss über die CFSE-Ausverdünnung gibt.

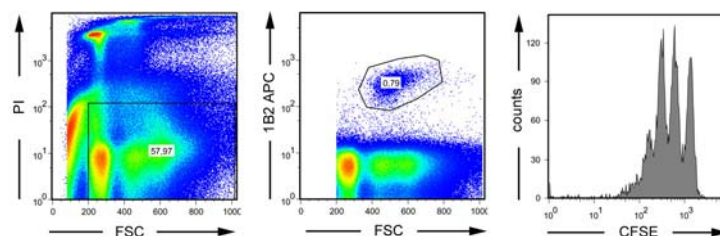


Abbildung II: Standard-Analyse eines CFSE-Experiments zur aHP 2C TCRtg T-Zellen

2.2.5.10 Zellsorting für Microarray Analysen von LIP T-Zellen

Das Zellsorting ist eine Spezialanwendung der Durchflusszytometrie. Beim Zellsort werden die Zellen nicht nur analysiert, sondern einzelne Zellpopulationen können aus der Zellsuspension isoliert und als hoch aufgereinigte Population für weitere Versuchszwecke verwendet werden. Die Zellsorts wurden in Zusammenarbeit mit der AG Hoffmann/Edinger an einem FACS Aria Zellsorter (BD) durchgeführt.

Zur Vorbereitung für den Zellsort wurden aus Milz und Lymphknoten Einzelzellsuspensionen hergestellt und mit ACK-Lysepuffer behandelt. Die Färbung der Proben erfolgte in sterilem PBS (1ml) mit unverdünnten Antikörpern (1 μl / 1ml PBS) für

15 Minuten bei 4°C. Die Proben wurden anschließend mit PBS gewaschen. Um Zellverklumpungen zu verhindern, wurde die Suspension vor dem Sorting über einen Pre-Separation Filter (Miltenyi Biotec) gegeben. Die Zellen wurden anschließend in einem geeigneten Volumen PBS aufgenommen.

Die gesortete Zellpopulation wurde in einem sterilen 2ml Eppendorfgefäß aufgefangen, in welchem ca. 50µl PBS vorgelegt wurden.

2.2.5.10.1 Polyklonale CD8⁺ LIP T-Zellen

Der Microarray für LIP polyklonale CD8⁺ T-Zellen wurde in Zusammenarbeit mit der Firma Miltenyi durchgeführt. Die gesorteten Zellen wurden in ein steriles 0,2ml Reaktionsgefäß überführt, einmal mit sterilem PBS gewaschen und in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert (8400 x g, 7 min). Anschließend wurden einzelne Populationen in SuperAmp Lysis Buffer resuspendiert, und wie im SuperAmp Preparation Kit (Miltenyi Biotec) vorgeschrieben bei -20°C eingefroren und auf Trockeneis zu Miltenyi geschickt. Die weitere Verarbeitung (mRNA, cDNA, Amplifizierung, Markierung der cDNAs mit Cy5 bzw. Cy3 sowie die anschließende Hybridisierung der Proben) wurde im Rahmen des „PIQOR Immunology Microarrays“ von der Firma Miltenyi durchgeführt. Der „PIQOR Immunology Microarray“ mit LIP polyklonalen CD8⁺ T-Zellen wurde insgesamt dreimal in unabhängigen Ansätzen durchgeführt.

2.2.5.10.2 Monoklonale 2C aHP T-Zellen

Der Microarray für aHP monoklonaler 2C TCRtg T-Zellen wurde in Zusammenarbeit mit der Microarray Facility am NKI in Amsterdam, NL durchgeführt. Auch in diesem Fall wurden die benötigten Zellpopulationen gesortet und mit PBS gewaschen. Die Zellpelletts wurden anschließend in 1ml Trizol (Invitrogen) aufgenommen und bei -20°C eingefroren. Zur weiteren Verarbeitung wurden die Proben auf Trockeneis in die Niederlande geschickt. Wiederum wurden drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt.

2.2.6 Immunhistochemische Methoden

2.2.6.1 Einbetten von Organen

Für Kryoschnitte: Zur Herstellung von Gefrierschnitten von Darm, Milz oder Lymphknoten wurden diese Organe zunächst im Einbettmedium Tissue Tek O.C.T.

Compound (Sakura, DiaTek) eingebettet und schockgefroren. Schädigungen der Organe beim Einfrieren in flüssigem Stickstoff können durch 2-Methylbutan vermieden werden: Anstatt das Organ direkt in flüssigen Stickstoff zu tauchen, wird es in Stickstoff-gekühltes Methylbutan getaucht. Anschließend wurden die schockgefrorenen Organe bei -80°C gelagert.

Für Paraffinschnitte: Bevor die Organe in Paraffin eingebettet werden konnten, wurden diese zunächst in einer 3-5%igen Formalinlösung gelagert. Die weitere Verarbeitung der fixierten Gewebe erfolgte in der Routine der Pathologieabteilung der Uniklinik Regensburg. Die in Paraffin eingegossenen Organe wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei RT gelagert.

2.2.6.2 Gewebeschnitte und Färbungen

2.2.6.2.1 Kryoschnitte

Die Tissue Tek-Blöcke wurden zunächst auf -20°C erwärmt, damit sich die eingebetteten Organe besser schneiden lassen. Mit einem Kältemikrotom wurden 5-8µm dicke Schnitte angefertigt, welche sofort auf Superfrost Objektträger (Menzel) gezogen wurden. Bis zur immunhistochemischen Markierung wurden die Objektträger bei -80°C gelagert.

2.2.6.2.2 Färbung von Kryoschnitten mit Hämatoxylin/Eosin

Kryoschnitte wurden zunächst auf RT erwärmt. Sobald die Schnitte abgetrocknet waren, wurden sie für fünf bis zehn Minuten mit Hämatoxylin (Mayers Hematoxylin Solution, Sigma-Aldrich) gefärbt und anschließend in warmem Leitungswasser gebläut. Die Gegenfärbung der Schnitte erfolgte mit Eosin (Eosin Y Solution, Sigma-Aldrich) für ca. 20 Sekunden. Die Objektträger wurden dann zweimal mit kaltem H₂O dest. kurz gespült und mit Eindeckmedium und einem Deckglas luftdicht versiegelt.

2.2.6.2.3 Paraffinschnitte

Von den eingebetteten Organen wurden am Mikrotom 4µm dünne Schnitte gefertigt und auf Objektträger gezogen. Um das Paraffin zu entfernen, wurden die Objektträger zweimal mit Xylol gewaschen und mit einer absteigenden Alkoholreihe behandelt. Anschließend wurden die Objektträger in Citratpuffer (pH 6,0) 15 Minuten lang erhitzt.

2.2.6.2.4 Färbung von Paraffinschnitten mit anti-CD3 und Hämatoxylin

Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden die Paraffinschnitte für die Färbung mit anti-CD3 dreimal mit PBS gewaschen und mit einem Peroxidase blockierenden Agens (DakoCytomation) für 10 Minuten behandelt. Unspezifische Bindungen wurden nach erneutem Waschen geblockt (5%iges Goatserum in PBS + 1% BSA, Sanquin). Die mit PBS gewaschenen Schnitte wurden mit dem Primärantikörper anti-CD3 (Herkunft: rabbit, Klon SP7, 1: 4000, NeoMarkers) über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Schnitte für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit Poly-HRP-Goat-anti-rabbit-IgG (PowerVision, ImmunoLogic) behandelt, dreimal mit PBS gewaschen und zur Entwicklung fünf Minuten mit dem DAB-Chromogen Substrat (DakoCytomation) inkubiert. Abschließend wurden die Schnitte mit H₂O dest. gewaschen und mit Hämatoxylin gegengefärbt.

Die Färbungen der Paraffinschnitte wurden am NKI in Amsterdam, NL durchgeführt.

2.2.6.3 Dokumentation

Durchlichtaufnahmen sowie fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen wurden mit einer Sony Digitalkamera an einem Axioskop 2 Plus Mikroskop der Firma Zeiss gemacht.

2.2.7 *in vitro* Assays

2.2.7.1 ELISA

Zur Bestimmung der von T-Zellen produzierten IFN γ -Menge wurde zunächst eine 96- well Platte (Flat Bottom, Greiner) über Nacht bei 4°C mit anti-mouse IFN γ mAK (0,1 mg/ml, BD Pharmingen) in Coatingpuffer beschichtet (50 μ l/well). Am nächsten Tag wurde die Platte zweimal mit ELISA-Waschpuffer gewaschen und für zwei Stunden mit PBS + 10% FCS abgesättigt. Nach zwei weiteren Waschschritten wurden die Proben in der jeweils benötigten Verdünnung sowie der Standard (rMu IFN γ , 0,2mg/ml, BD Pharmingen) mit einer Startkonzentration von 100 ng/ml aufgetragen. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag wurden die Platten viermal mit ELISA-Waschpuffer gewaschen. Danach wurden zunächst der biotinylierte anti-mouse IFN γ -Detektorantikörper (0,5mg/ml, BD Pharmingen) aufgetragen, nach einstündiger Inkubation und fünf weiteren Waschschritten dann die Streptavidin-Peroxidase (1 : 3000 verdünnt, Dianova); beide Antikörper wurden dafür in PBS + 10% FCS verdünnt. Nach 30 Minuten wurde die Platte erneut fünfmal gewaschen. Zur Entwicklung wurden pro well 100 μ l TMB-Substratlösung

aufgetragen, und sobald sich eine Blaufärbung zeigte, wurde die Reaktion mit 2N Schwefelsäure (Merck) abgestoppt. Die Extinktion wurde abschließend im ELISA-Reader (precision microplate reader, MWG Biotech) bei 450nm gegen 650nm mit dem SOFTmax Programm gemessen und ausgewertet.

2.2.7.2 Proliferationsassay

Zur Bestimmung der proliferativen Kapazität von T-Zellen wurde ein ³H-Thymidin Proliferationsassay durchgeführt. Dabei wurden jeweils 50.000 T-Zellen/well in eine zweimal mit PBS gewaschene 96-well Platte (Flat Bottom, tissue culture treated, Corning Costar) pipettiert, welche zuvor mit 1µg /ml anti-CD3 und/oder 1µg /ml anti-CD28 in PBS bzw. nur mit PBS beschichtet wurde (zwei Stunden, 37°C). Die Zellen inkubierten zunächst für 42 Stunden bei 37°C im Brutschrank. Nach Zugabe von ³H-Methyl-Thymidin (100µCi/well, Hartmann Analytic) können proliferierende T-Zellen dieses in ihre DNA einbauen. Die Inkorporation des radioaktiven Materials wurde nach sechs Stunden gestoppt, indem die Zellen mit destilliertem Wasser lysiert wurden. Die dabei freigesetzte DNA wurde auf Uni-Filter-Platten (1,2 µm Porengröße, Perkin Elmer Life Sciences) aufgefangen. Die getrocknete Filterplatte wurde mit 50µl Szintillationsflüssigkeit pro well versetzt und in einem Szintillationszähler (Perkin Elmer Life Sciences) gemessen.

2.2.7.3 ⁵¹Cr-Release Assay

Die Fähigkeit von T-Zellen *in vitro* spezifische Tumorzellen zu lysieren wurde mit Hilfe eines ⁵¹Cr-Release Assays bestimmt. Die Tumorzellen wurden dazu zunächst mit ⁵¹Chrom markiert (100µCi, 60 Minuten, 37°C), dreimal mit Medium gewaschen und in einer 96-well Platte (Cell Culture treated, V-Bottom, Corning Costar) mit 2000 Zellen / well ausplattiert. Die T-Zellen wurden im angegebenen Verhältnis von T-Zellen : Tumorzellen für sechs Stunden co-inkubiert. Nach der Inkubation wurden je 50 µl des Überstandes jedes wells auf eine Messplatte (Lumaplate 96, Packard) pipettiert und die counts per minute (cpm) jedes wells in einem Counter gemessen.

Der Prozentsatz der spezifischen Lyse (x) wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{cpm(x) - cpm(min)}{cpm(max) - cpm(min)} \times 100 = \% \text{ spezifische Lyse}$$

Die maximale ^{51}Cr Freisetzung bzw. Lyse (cpm max) wurde durch Zugabe von Triton X-100 (Sigma-Aldrich) in H_2O dest. erreicht. Für die spontane ^{51}Cr -Freisetzung (cpm min) wurden Tumorzellen ohne T-Zellen inkubiert.

2.2.8 Immunpräzipitation und Pull-down Assay

2.2.8.1 Biotinylierung

Zunächst wurden die Zellen dreimal mit PBS (pH 8,0) gewaschen und auf $2,5 \times 10^6$ / 1ml PBS (pH 8,0) eingestellt. Von einer 20mM Biotinlösung (EZ-Link NHS-Biotin gelöst in DMSO, Pierce) wurden 100 μl zu 1ml der Zellsuspension pipettiert. Nach einer Inkubation von 30 Minuten wurde dreimal mit PBS (pH 8,0) + 100mM Glycin (Merck) gewaschen.

2.2.8.2 Lyse

Das Zellpellet wurde in 1ml eiskaltem Lysepuffer resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation in einer Tischzentrifuge (15min, 14200 x g, 4°C) wurde der Überstand, welcher das Proteinlysate enthält, abgenommen und bei -20°C aufbewahrt bzw. sofort für Immunpräzipitation oder Pull-down Assay eingesetzt.

2.2.8.3 Immunpräzipitation und Pull-down Assay

Für die Immunpräzipitation wurde eine Säule des Seize Primary Immunoprecipitation Kit (Pierce) mit 100 μg des anti-PD-1-Antikörpers (affinity purified) beladen bzw. für den Pull-down Assay mit 100 μg der PDL-1 Chimäre (rmB7-H1/Fc Chimera, R&D Systems). Immunpräzipitation und Pull-down Assay wurden nach Protokoll des Seize Primary Immunoprecipitation Kit (Pierce) durchgeführt.

Dazu wurden die biotinylierten Proteinlysate auf die Säulen aufgetragen. Proteine, welche an die Säule binden, wurden von dort gemäß Protokoll mittels einiger Waschschriffe und über mehrere Elutionsschritte wieder abgelöst. Die gewonnen Eluate enthalten biotinylierte Proteine, welche mittels einer SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran gebロットet werden konnten.

2.2.8.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Eluate erfolgte mittels der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese in Flachgelen. Verwendet wurden Gele der Größe 85 mm x 65 mm x 1 mm, die Acrylamidkonzentration betrug im Trenngel 10%, im Sammelgel 5%. Der Elektrophoreselauf erfolgte in einer Biometra-Apparatur bei 30 mA für ca. zwei Stunden.

2.2.8.4.1 Herstellung von 10%igen Gelen

Zusätze	10%iges Trenngel (10ml)	5%iges Sammelgel (4ml)
H ₂ O _{bidest}	3,4 ml	2,5 ml
Acrylamid/bis-Acrylamid Lösung (30%)	3,4 ml	0,7 ml
Trenngelpuffer Tris HCl pH 8,9	2,5 ml	-
Sammelgelpuffer Tris HCl pH 6,9	-	0,5 ml
Ammonium Persulfat (APS), (10% (w/v))	0,7 ml	0,3 ml
TEMED	10 µl	7 µl

APS (Sigma-Aldrich) muss für jedes Gel frisch mit H₂O dest. angesetzt werden, die übrigen Zusätze können bei 4°C aufbewahrt werden.

APS und TEMED (Sigma-Aldrich) wurden zuletzt zum Trenngel-Gemisch gegeben, das daraufhin sofort zwischen zwei vertikal fixierte Glasplatten gegossen wurde, welche seitlich mit einer Gummidichtung versehen worden waren. Um eine gleichmäßige Polymerisation an der Oberkante zu erhalten, erfolgte eine Übersichtung mit Isopropanol. Nach dem Auspolymerisieren des Trenngels wurde das Isopropanol entfernt. Das Sammelgel wurde zugegeben und mit einem Kamm für die Proben-Auftragstaschen versehen. Nach Polymerisation des Sammelgels wurde die Gummiabdichtung entfernt, das Gel in die Elektrophorese-Apparatur eingesetzt und diese mit Elektrophoresepuffer befüllt.

2.2.8.4.2 Probenvorbereitung

Je 20µl Eluat wurden mit 5µl des Lane Marker Sample Buffers (Pierce) versetzt, einem 5-fach konzentrierten reduzierenden Auftragspuffer. Die Proben wurden für fünf Minuten bei 95°C im Heizblock erhitzt. Die auf RT abgekühlten Proben wurden vor dem Beladen des Gels kurz abzentrifugiert. Der Elektrophoreselauf wurde gestoppt, sobald sich die pinke Bande des Lane Markers dem Ende des Gels näherte. Als Standard wurde der Protein Kaleidoscope Standards (Bio-Rad) verwendet und nach Anleitung vorbereitet.

2.2.8.5 Western Blot

SDS-Polyacrylamidgele wurden zunächst 45 Minuten in Elektrophoresepuffer äquilibriert. Vor Verwendung der hydrophoben PVDF-Membran (Immobilon P, Millipore) musste diese mindestens eine Minute in Methanol p.a (Merck) eingelegt werden. Der Elektrotransfer von Proteinen auf die PVDF-Membran erfolgte in einer Blot-Apparatur (Fastblot B44, Biometra). Vor dem Blotten wurden das Gel und die Membran vom

Laufpuffer bzw. vom Methanol in den kalten Transferpuffer (Towbin et al., 1979) überführt. Dort äquilibrierten diese zusammen mit den benötigten Whatman 3MM-Filterpapierstücken (Biometra) 15 Minuten lang.

Der Aufbau des Elektroblobs in der Mitte der Apparatur beginnt mit drei Lagen Whatman-Filterpapier, darauf werden zunächst die Membran und darüber das Gel gelegt. Den Abschluss bilden wiederum drei Lagen Filterpapier. Luftblasen zwischen den einzelnen Schichten wurden durch vorsichtiges Rollen mit einer Pipette nach jeder neu aufgelegten Komponente entfernt. Die Blotting-Dauer betrug ca. 30 min bei 23 V.

Um die geblotteten Proteine auf der Membran sichtbar zu machen, wurde mit dieser wie folgt verfahren:

Waschen	TBS-Tween20	10 min
Blocken	TBS-Tween20 + 5 % (w/v) Magermilchpulver	1 h
Waschen	TBS-Tween20	10 min
Detektion Biotin	Peroxidase conjugated Streptavidin (Dianova) 1: 10000 Verdünnung in TBS-Tween20 + 5 % (w/v) Magermilchpulver	1 h
Waschen	TBS-Tween20	2 x 10 min

Alle Schritte wurden unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur durchgeführt.

2.2.8.6 Detektion

Die Detektion der mit Antikörper markierten Proteinbanden erfolgte mit Hilfe des ECL-Detektion Kits (Amersham Biosciences) sowie des HyperfilmTM ECL (Amersham Biosciences) nach Angaben des Herstellers.

2.2.9 Statistik

Für statistische Analysen wurde das MiniTab Programm verwendet. Die Ergebnisse wurden stets als Mittelwerte \pm Standardabweichungen angegeben. Die Daten verschiedener Gruppen wurden mit Hilfe des Student t-Tests miteinander verglichen. Werte von $p < 0,05$ wurden dabei als statistisch signifikant betrachtet und in den Abbildungen mit ** gekennzeichnet.

III. Ergebnisse

1. Etablierung der Lymphopenie-induzierten Proliferation im Mausmodell

Die Lymphopenie-induzierte Proliferation (LIP) peripherer, naiver muriner T-Zellen kann experimentell bislang nur durch Transfer dieser Zellen in eine lymphopene Maus ausgelöst werden. Eine Induktion unter *in vitro* Bedingungen ist bislang nicht möglich. Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb zunächst die Induktion bzw. die Inhibition der LIP sowohl transgener als auch polyklonaler naiver T-Zellen im Mausmodell mit RAG2^{-/-} und P14 TCRtg/RAG2^{-/-} Mäusen in unserem Labor etabliert.

Zunächst wurden wie im Methodenteil beschrieben CD8⁺ bzw. CD4⁺ naive T-Zellen aufgereinigt und gegebenenfalls mit CFSE markiert. Anschließend erfolgte der Transfer von mindestens 3 x 10⁶ bis maximal 15 x 10⁶ (CFSE-markierten) T-Zellen in die anästhesierte Maus via retrobulbärer Injektion. Je nach Zellpopulation wurde das Experiment zu verschiedenen Zeitpunkten beendet, wobei Milz und/oder mesenteriale Lymphknoten (mLN) entnommen wurden, um entweder im FACS analysiert bzw. in anschließenden Experimenten als LIP T-Zellen verwendet zu werden.

1.1 LIP in der chronisch-lymphopenen RAG2^{-/-} Maus

1.1.1 Induktion der aHP von 2C TCRtg T-Zellen

Proliferieren CFSE-markierte T-Zellen, so wird der ursprüngliche CFSE-Gehalt bei jeder Teilung gleichmäßig auf die beiden Tochterzellen verteilt. In der Histogrammdarstellung einer FACS-Analyse wird deshalb jede Zellteilung als ein „step“ sichtbar. Die Proliferation von Zellen kann meist über ca. sieben Zellteilungen verfolgt werden, dann ist das CFSE soweit ausverdünnt, dass die Zellen im FACS wieder als CFSE-negative Zellen detektiert werden (Lyons and Parish, 1994; Weston and Parish, 1990).

In unseren Experimenten zeigten die 2C TCRtg T-Zellen akute homöostatische Proliferation (aHP) und haben sich nach sechs Tagen in der RAG2^{-/-} Maus ca. dreimal geteilt (Abb. 1A). In einer nicht-lymphopenen P14 TCRtg/RAG2^{-/-} Maus verhinderten die

in der Empfängermaus vorhandenen $CD8^+V\alpha 2^+$ T-Zellen eine Induktion der aHP. Diese transferierten T-Zellen besaßen deshalb auch sechs Tage nach Transfer noch ihren ursprünglichen CFSE-Gehalt (Abb. 1B).

1.1.2 Induktion der aHP und der BLP von polyklonalen T-Zellen

Auch polyklonale T-Zellen zeigten eine langsame homöostatische Proliferation, vergleichbar mit der von 2C TCRtg T-Zellen. $CD8^+$ T-Zellen (Abb. 1C) teilten sich mit ca. sechs Teilungen in fünf Tagen jedoch wesentlich häufiger als $CD4^+$ T-Zellen (Abb. 1E) mit zwei Zellteilungen in 11 Tagen.

Zusätzlich detektierten wir aber eine viel schnellere sog. Burst-like (Endogene, Spontane) Proliferation, kurz BLP genannt. Unterscheidbar sind diese beiden proliferativen Immunantworten anhand der verschieden schnellen Ausverdünnung des CFSE. aHP T-Zellen sind gekennzeichnet durch einzelne CFSE-„steps“, BLP T-Zellen dagegen sind zu allen untersuchten Zeitpunkten nur als CFSE-negative Population detektierbar. Da nur die lebenden, PI-negativen T-Zellen für die Auswertung berücksichtigt wurden, ist es auszuschließen, dass es sich bei der CFSE-negativen Population um tote oder präapoptotische Zellen handelt.

Nach Transfer polyklonaler T-Zellen in eine P14 TCRtg/RAG2^{-/-} Maus zeigten weder $CD4^+$ noch $CD8^+$ T-Zellen aHP. Die BLP der polyklonalen T-Zellen fand dagegen auch unter nicht-lymphopenen Bedingungen in der P14 TCRtg/RAG2^{-/-} Maus statt. Ein einzelner unspezifischer transgener T-Zellklon reicht also aus, um die aHP von T-Zellen zu unterdrücken, nicht aber, um auch die BLP zu supprimieren. (Abb. 1D und 1F). Diese Tatsache lässt auf unterschiedliche Regulationsmechanismen der aHP und der BLP schließen, und rechtfertigt zugleich auch die Unterteilung der LIP in zwei verschiedene Prozesse.

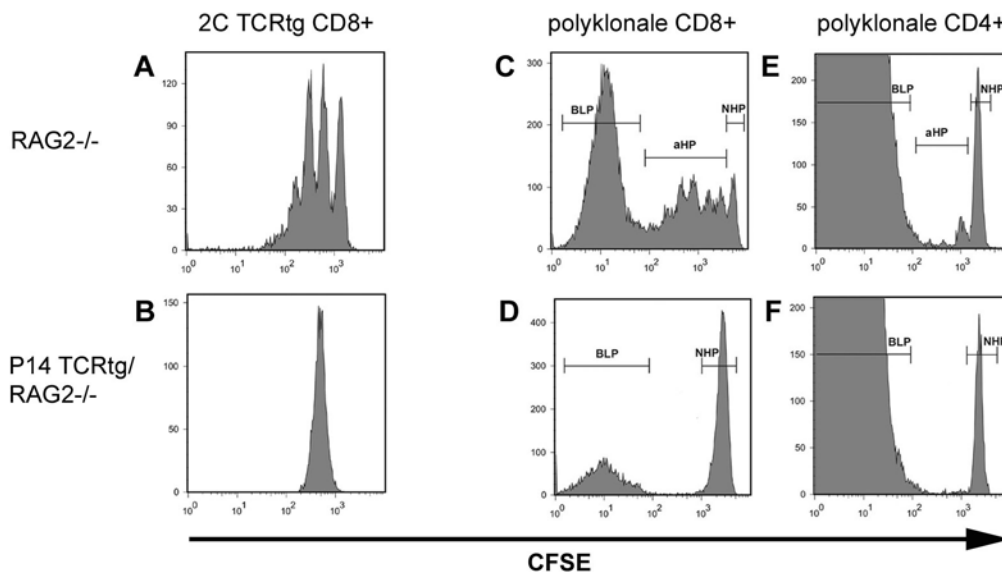


Abbildung 1: Induktion bzw. Inhibition der LIP im chronisch-lymphopenen Mausmodell mit $RAG2^{-/-}$ bzw. $P14\ TCRtg/ RAG2^{-/-}$ Mäusen

8×10^6 naive, CFSE-markierte 2C TCRtg T-Zellen (A, B) bzw. 15×10^6 naive, CFSE-markierte polyklonale $CD8^{+}$ T-Zellen (C, D) oder 8×10^6 CFSE-markierte polyklonale $CD4^{+}$ T-Zellen (E) wurden retrobulbär in $RAG2^{-/-}$ bzw. in $P14tg/ RAG2^{-/-}$ Mäuse transferiert. Nach sechs (A und B) bzw. nach vier (C und D) oder elf (E und F) Tagen wurden die entnommenen Milzen und mLN zu Einzelzellsuspensionen verarbeitet, mit ACK lysiert und für die FACS-Analyse vorbereitet.

Mittels Propidiumjodid wurde ein Lebendgate auf PI-negative Zellen gesetzt. Darin enthaltene 2C TCRtg T-Zellen wurden als 1B2-positive T-Zellen identifiziert. Lebende, transferierte $CD8^{+}$ bzw. $CD4^{+}$ polyklonale T-Zellen wurden mit Hilfe von anti-CD3 und anti-CD8 bzw. anti-CD4 als doppelt-positive T-Zellen identifiziert.

Die Histogrammdarstellungen geben Aufschluss über die Anzahl der Zellteilungen während der aHP. Zudem verdeutlichen sie die unterschiedlich schnelle Ausverdünnung des CFSE von aHP und BLP T-Zellen.

BLP: Burst-Like Proliferation; **aHP:** (akute) Homöostatische Proliferation, **NHP:** (noch) Nicht Homöostatische Proliferierende (T-Zellen)

1.2 LIP in der akut-lymphopenen bestrahlten C57BL/6 Maus

Neben dem chronischen Lymphopeniemodell der $RAG2^{-/-}$ Maus gibt es zudem die Möglichkeit, C57BL/6 Wildtypmäuse durch Bestrahlung akut lymphopen zu machen. Nach adoptivem Transfer sowohl monoklonaler 2C TCRtg T-Zellen als auch polyklonaler $CD8^{+}$ T-Zellen zeigten sich auch unter akut-lymphopenen Bedingungen vergleichbare CFSE-Muster der aHP bei monoklonalen bzw. der aHP und BLP bei polyklonalen T-Zellpopulationen (Abb. 2A und C). Wie in der $P14\ TCRtg/RAG2^{-/-}$ Maus fand auch in unbehandelten Wildtypmäusen keine der beiden LIP Proliferationen statt (Abb. 2B und D). Die LIP kann also sowohl unter akuter Lymphopenie stattfinden, welche nach Bestrahlung eines Wildtypmiers entsteht, als auch unter chronisch-lymphopenen Bedingungen, ausgelöst durch einen genetischen Defekt bei der Lymphozytenreifung.

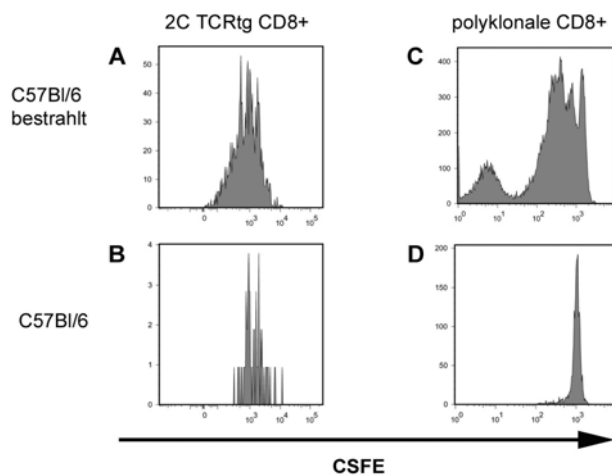


Abbildung 2: Induktion bzw. Inhibition der LIP im akut-lymphopenen Mausmodell mit bestrahlten bzw. unbestrahlten C57BL/6-Mäusen

8×10^6 naive, CFSE-markierte 2C TCRtg T-Zellen (A, B) bzw. 15×10^6 CFSE-markierte polyclonale $CD8^+$ T-Zellen (C, D) wurden retrobulbär in mit 600 cGy bestrahlte bzw. in unbehandelte C57BL/6 Mäuse injiziert. Die Milzen und mLN wurden nach sechs (A und B) bzw. nach vier (C und D) Tagen wie in Abbildung 1 beschrieben verarbeitet und im FACS analysiert

2. Charakterisierung des Phänotyps von monoklonalen aHP 2C TCRtg und polyclonalen LIP T-Zellen in Abgrenzung zu naiven und antigenaktivierten T-Zellen

2.1 Der Phänotyp monoklonaler aHP 2C TCRtg T-Zellen

T-Zellen tragen je nach Aktivierungsstatus unterschiedliche Expressionsmuster der verschiedenen Oberflächenmarker. FACS-Analysen von naiven, frisch aufgereinigten 2C TCRtg T-Zellen exprimierten im Vergleich zu repetitiv *in vitro* mit P815.B7 stimulierten 2C TCRtg T-Zellen andere Marker auf der Zelloberfläche (Abb. 3A). Nach Kontakt mit ihrem spezifischen Antigen wurde L-Selektin (CD62L) sukzessive schwächer exprimiert, wohingegen CD44, CD25 (IL-2R, α -Kette), CD122 (IL-2/IL-15R, β -Kette) und PD-1 verstärkt exprimiert wurden. Die Expression für CD127 (IL-7R, α -Kette) und PDL-1 blieb weitgehend konstant.

Ly6C wurde zu Beginn einer *in vitro* Stimulation kurzzeitig verstärkt exprimiert (Tag 5 im Vergleich zu Tag 9), zeigte jedoch nach repetitiver Stimulation (Tag 14) wieder seine ursprüngliche Oberflächenexpression (Abb. 3B).

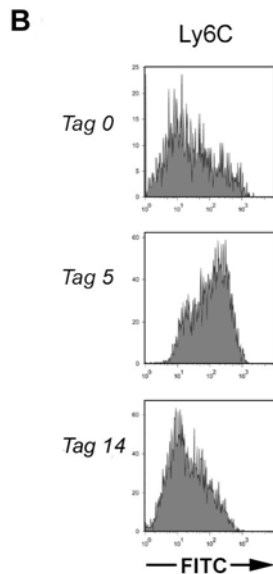
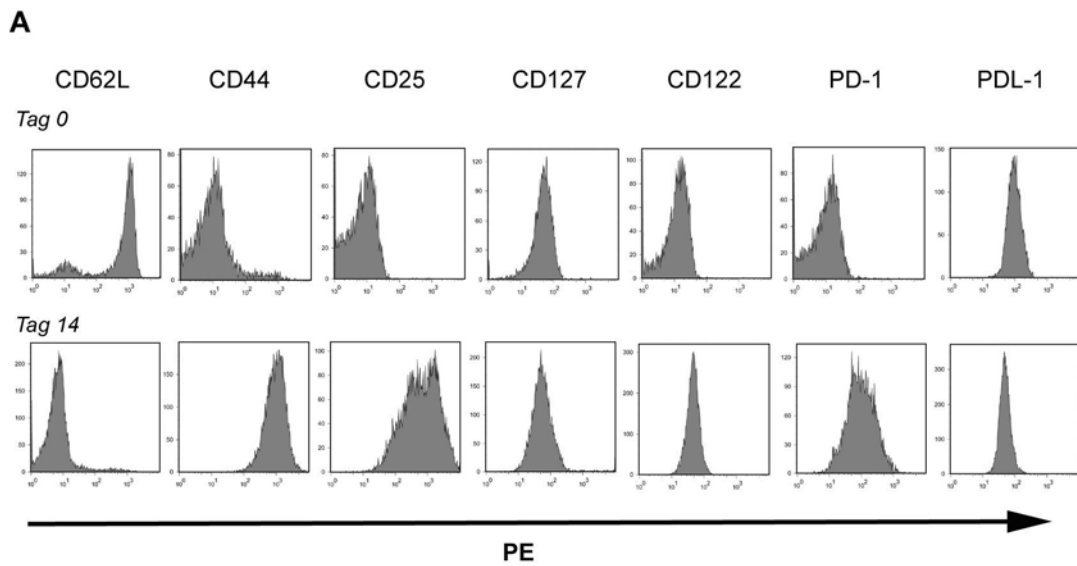


Abbildung 3: Oberflächenmarkerexpression auf naiven bzw. (repetitiv) *in vitro* stimulierten 2C TCRtg T-Zellen

A) Ca. 100.000 naive (Tag 0) bzw. *in vitro* stimulierte (Tag 14) T-Zellen wurden jeweils mit anti-1B2-FITC und anti-CD8-APC in Kombination mit jeweils einem der PE-markierten Antikörper gegen die Oberflächenmarker CD62L, CD44, CD25, CD127, CD122, PD-1 und PDL-1 gefärbt und im FACS analysiert. Die Histogramme zeigen die jeweilige Expressionsstärke der analysierten Oberflächenmarker.

B) Ca. 100.000 naive (Tag 0) bzw. *in vitro* stimulierte (Tag 5 und Tag 14) T-Zellen wurden für den Oberflächenmarker Ly6C gefärbt, in Kombination mit anti-1B2-APC und anti-CD8-PE gefärbt, da dieser Marker nur als FITC-Konjugat erhältlich ist. Die Histogramme zeigen die Ly6C-Expression auf naiven T-Zellen (Tag 0) im Vergleich zu fünf bzw. neun Tagen *in vitro* stimulierten T-Zellen.

Akut homöostatisch proliferierende T-Zellen zeigten dagegen ein intermediäres Muster von Oberflächenmarkern. Mittels der CFSE-Markierung der 2C TCRtg T-Zellen konnte das Expressionsmuster verschiedener Oberflächenmarker der einzelnen Teilungsschritte während der aHP analysiert werden.

Die Expression von CD44 wurde während der aHP hochreguliert, und ist auch am Tag 65 noch erhöht. CD62L blieb über den gesamten Zeitraum auf den aHP 2C TCRtg T-Zellen erhalten, die Expression steigt im Verlauf der Zellteilungen sogar noch an (Tag 24). Zum spätesten untersuchten Zeitpunkt waren immer noch ca. 80 Prozent der T-Zellen stark positiv für CD62L. Die Rezeptoren für die beiden mit der aHP in Zusammenhang stehenden Zytokine IL-7 (= CD127) und IL-15 (= CD122) wurden ähnlich wie CD44 im Verlauf der LIP verstärkt exprimiert, und auch sie blieben dann bis Tag 65 auf der Zelloberfläche erhalten. Im Gegensatz dazu wurde CD25, ein klassischer Marker für antigenaktivierte T-Zellen, zu keinem Zeitpunkt der aHP auf den T-Zellen in einem relevanten Ausmaß exprimiert.

Die meisten aHP 2C TCRtg T-Zellen waren bezüglich ihrer PD-1-Expression negativ. Der Ligand zu PD-1, PDL-1, behielt seine konstante Expression über den gesamten Zeitraum bei, vergleichbar mit der Expression dieses Markers auf naiven und antigenaktivierten 2C TCRtg T-Zellen (Abb. 4A).

Da der Marker Ly6C nur als FITC-Konjugat zur Verfügung stand, konnte dieser nicht gemeinsam mit CFSE eingesetzt werden. Es zeigte sich, dass Ly6C von aHP 2C TCRtg T-Zellen, die 21 bzw. 65 Tage im lymphopenen Empfängertier waren, sehr stark exprimiert wurde. Die Expression dieses Markers war damit im Vergleich zu naiven und zu repetitiv *in vitro* stimulierten T-Zellen stark erhöht (Abb. 4B).

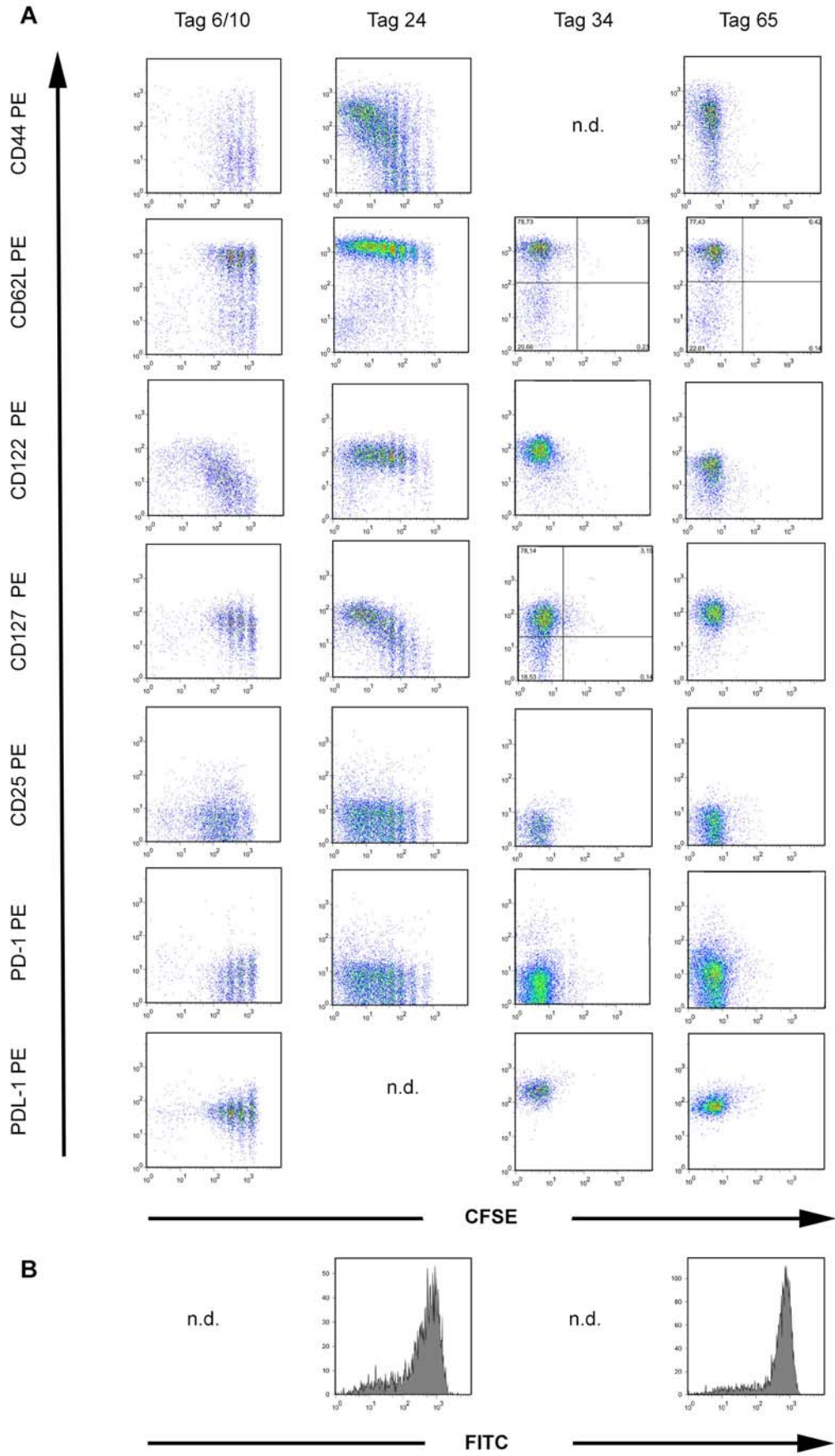
Abbildung 4: Veränderung des Expressionsmusters von Oberflächenmarkern auf aHP 2C TCRtg T-Zellen im Zeitverlauf

A) Jeweils 8×10^6 CFSE-markierte 2C TCRtg T-Zellen wurden retrobulbär in RAG2^{-/-} Mäuse transferiert. Die Entnahme von Milzen und mLN erfolgte nach sechs bzw. zehn, 24, 34 und 65 Tagen. Einzelzellsuspensionen wurden nach einem ACK-Lyseschnitt für die FACS-Analyse mit den angegebenen Oberflächenmarkern gefärbt. Zunächst wurden mittels PI lebende (PI-negative) von toten (PI-positiven) Zellen unterschieden. Im Folgenden wurde ein Gate auf die anti-1B2-positiven (2C TCRtg) T-Zellen gesetzt.

Die Histogramme zeigen jeweils die Expression der Oberflächenmarker im Zeitverlauf, gekennzeichnet durch die CFSE-Verdünnung.

B) Für die Analysen des Ly6C-Markers wurden die T-Zellen vor Transfer nicht mit CFSE markiert, da der Ly6C-Antikörper nur als FITC-Konjugat zur Verfügung stand. Zum Beenden des Experiments wurden die Zellen wie im Methodenteil beschrieben für eine FACS-Analyse vorbereitet und mit anti-1B2-APC, anti-CD8PE und anti-Ly6C-FITC gefärbt. Für die Histogrammdarstellung wurden nur die PI-negativen 2C (=CD8-PE und 1B2-APC doppelt-positiven) T-Zellen berücksichtigt.

Die Histogramme zeigen die Ly6C-Expression zu den angegebenen Zeitpunkten der aHP.



Der Vergleich all dieser Oberflächenmarker ergibt ein Expressionsmuster für die aHP 2C TCRtg T-Zellen, das sowohl Kennzeichen einer naiven T-Zelle trägt, wie die Expression von CD62L und CD127, bzw. die fehlende Expression von CD25 und PD-1, als auch Übereinstimmungen mit einer antigenstimulierten Effektor T-Zelle aufweist, wie die Expression von CD44 und CD122. Bezüglich der Ly6C-Expression zeigt die aHP T-Zelle Ähnlichkeit mit einer klassischen Memory T-Zelle (Murali-Krishna and Ahmed, 2000).

Diese spezielle Mischung von Kennzeichen beider Aktivierungszustände grenzt die aHP T-Zellen zwar deutlich von mit Fremdanigen stimulierten T-Zellen ab, lässt sie aber gleichzeitig doch als aktivierte T-Zellen erscheinen. Wie schon in der Einleitung erwähnt, wird dieser spezielle Phänotyp der aHP T-Zellen von Murali-Krishna als sog. „Memory-like phenotype“ beschrieben (Murali-Krishna and Ahmed, 2000). Im Folgenden wird der Phänotyp von LIP bzw. aHP T-Zellen als „LIP bzw. aHP (Memory) Phänotyp“ bezeichnet.

2.2 Polyklonale aHP und BLP T-Zellen zeigen unterschiedliche Expressionsmuster der Oberflächenmarker

Da polyklonale T-Zellen sowohl akut homöostatisch als auch Burst-like proliferieren, stellte sich die Frage, ob beide dieser unter lymphopenen Bedingungen stattfindenden proliferativen Immunantworten einen vergleichbaren Phänotyp aufweisen. Doch wie in *Abbildung 5* anhand des Adhäsionsmoleküls CD62L gezeigt, unterscheiden sich akut homöostatisch und Burst-like proliferierende polyklonale T-Zellen nicht nur aufgrund ihrer unterschiedlich schnellen Proliferationsrate, sondern auch im Expressionsmuster ihrer Oberflächenmarker.

Eine Unterteilung der LIP nach dem jeweiligen CFSE-Gehalt der einzelnen Populationen in aHP, BLP und NHP T-Zellen (transferierte, CFSE-markierte T-Zellen, welche im Empfängertier (noch) **N**icht **H**omöostatisch **P**roliferiert haben), ermöglichte einen leichteren Vergleich dieser T-Zellpopulationen mit naiven und *in vitro* stimulierten polyklonalen T-Zellen. Problematisch erwies sich dabei oft die Abgrenzung von BLP T-Zellen zu aHP T-Zellen, die das CFSE durch mindestens sieben Zellteilungen ausverdünnt haben. Da die proliferative Kapazität von CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen sehr unterschiedlich ist, wurde das Expressionsmuster der Oberflächenmarker für diese beiden polyklonalen T-Zellpopulationen analysiert.

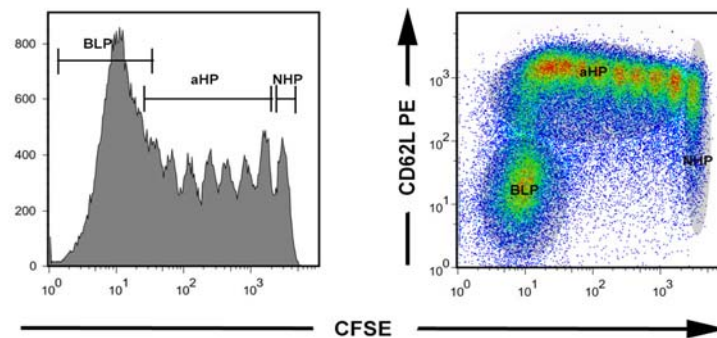


Abbildung 5: Unterteilung von LIP CD8⁺ T-Zellen in BLP, aHP und NHP T-Zellen

Die Unterteilung der LIP CD8⁺ T-Zellen erfolgte in der Histogrammdarstellung (links) aufgrund des hohen, mittleren oder geringen CFSE-Gehalts bzw. in der Dotplotdarstellung (rechts) aufgrund der unterschiedlichen CD62L-Expression in Kombination mit dem jeweiligen CFSE-Gehalt der T-Zellpopulationen. Zellen, welche sich nicht geteilt haben, und noch ihre ursprüngliche CFSE-Intensität besitzen, werden als NHP T-Zellen bezeichnet. T-Zellen, welche akut homöostatisch proliferierten und eine starke Expression für CD62L zeigten, wurden als aHP T-Zellen bezeichnet, und schließlich enthält die BLP-Fraktion die CFSE- und CD62L-negativen T-Zellen.

2.2.1 Analyse der Oberflächenmarker von aHP, BLP und NHP CD8⁺ polyklonalen T-Zellen im Vergleich mit naiven und antigenaktivierten Populationen

Naive polyklonale CD8⁺ T-Zellen zeigten eine starke Expression für CD62L, welche nach Stimulation *in vitro* mit anti-CD3- und anti-CD28-Antikörpern und Zugabe von 10U IL-2 (vgl. Methodenteil) schnell abnahm (Abb.6). CD44 wurde auf *in vitro* stimulierten T-Zellen verstärkt exprimiert, und auch die Expressionsmuster für CD25, CD122 und PD-1 zeigten einen leichten Anstieg der Rezeptorexpression. Die Expression von CD127 blieb auf naiven und *in vitro* stimulierten, polyklonalen CD8⁺ T-Zellen konstant.

Die Population der NHP T-Zellen zeigte, dass allein durch den Transfer naiver T-Zellen in einen lymphopenen Empfänger keine Veränderungen im Expressionsmuster entstehen. Aufgrund des hohen CFSE-Gehalts dieser Zellpopulation war die Fluoreszenz allerdings so stark, dass diese auch den PE-Kanal beeinflusste. Dadurch ergab sich sowohl für die CD25- als auch für die PD-1-Expression jeweils ein um ca. eine Zehnerpotenz nach rechts verschobenes Histogramm, was somit eine verstärkte Expression dieser beiden Marker nur vortäuschte.

Bezüglich der (a)HP Population entwickelten polyklonale CD8⁺ T-Zellen einen vergleichbaren aHP Phänotyp wie monoklonale 2C TCRtg T-Zellen.

Der Phänotyp der BLP T-Zellen unterschied sich jedoch deutlich vom aHP Phänotyp: Die CD62L-Expression wurde wie bei *in vitro* stimulierten T-Zellen deutlich herunterreguliert und CD44 wurde im Vergleich zur aHP noch etwas stärker exprimiert. Außerdem wurde

die PD-1-Expression partiell hochreguliert. CD25 fehlte weitgehend auf BLP T-Zellen, was diese wiederum von der antigenaktivierten T-Zelle abgrenzt, und die Expression für CD122 war vergleichbar mit der von aHP und *in vitro* stimulierten T-Zellen. Besonders auffällig war die CD127-Expression der BLP T-Zellen, denn nur etwa die Hälfte dieser T-Zellen hielt die Expression des IL-7 Rezeptors aufrecht. Dieser Verlust ist typisch für Effektor T-Zellen, kurz nachdem diese durch Fremdanigen aktiviert wurden (Park et al., 2004). Neben der unterschiedlichen proliferativen Kapazität der CD8⁺ polyklonalen aHP und BLP T-Zellen kennzeichnen auch diese unterschiedlichen Expressionsmuster die beiden unter Lymphopenie stattfindenden proliferativen Immunantworten als zwei eigenständige Prozesse.

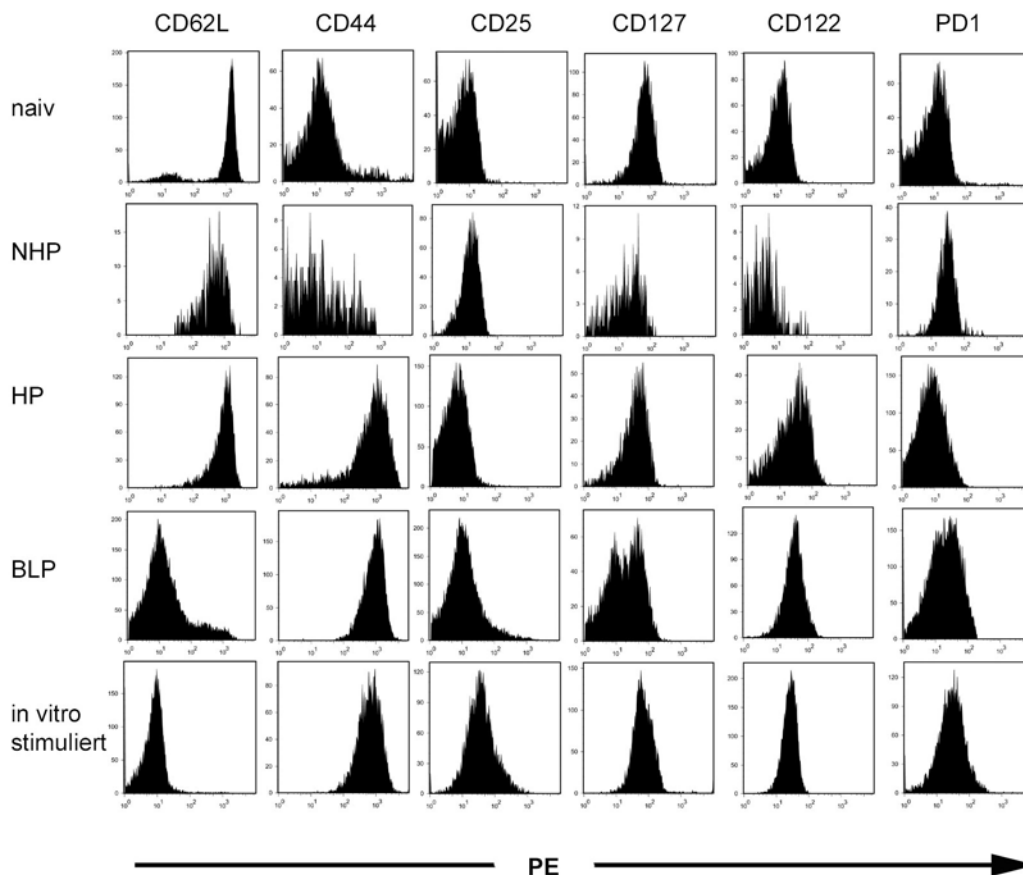


Abbildung 6: Expressionsmuster von Oberflächenmarkern auf polyklonalen aHP und BLP CD8⁺ T-Zellen nach fünf Tagen in lymphopener Umgebung im Vergleich zu naiven und *in vitro* stimulierten CD8⁺ polyklonalen T-Zellen

Jeweils 8×10^6 CFSE-markierte polyklonale CD8⁺ T-Zellen wurden retrobulbär in RAG2^{-/-} Mäuse transferiert. Die Entnahme von Milzen und mLN erfolgte nach fünf Tagen. Einzelzellsuspensionen dieser Organe wurden zunächst über einen Ficollschritt gereinigt und anschließend für die FACS-Analyse vorbereitet. Mittels PI wurden die lebenden, PI-negativen Zellen identifiziert, und mittels anti-CD3-PE und anti-CD8-APC konnten die doppelt-positiven T-Zellen gekennzeichnet werden.

Zur Charakterisierung der einzelnen Oberflächenmarker wurden die CFSE-Histogramme dieser T-Zellen in BLP, aHP und NHP Subpopulationen entsprechend der jeweiligen CFSE Konzentration unterteilt (vgl. Unterteilungen in (Abb. 5)). Die dargestellten Histogramme zeigen jeweils von oben nach unten angeordnet die Expression eines Oberflächenmarkers für naive, NHP, aHP, BLP und *in vitro* stimulierte CD8⁺ T-Zellen.

2.2.2 Oberflächenmarker der Subpopulationen CD4⁺ polyklonaler T-Zellen

Da CD4⁺ polyklonale T-Zellen eine deutlich langsamere aHP zeigten (Abb.1), untersuchten wir auch diese T-Zellpopulation explizit auf ihre Markerkonstellation. Wie die CD8⁺ polyklonalen T-Zellen unterteilten wir dazu auch die CD4⁺ polyklonalen T-Zellen in aHP, BLP und NHP T-Zellpopulationen. Für die Marker CD62L, CD44, CD25, CD127 und CD122 zeigten CD4⁺ im Vergleich zu CD8⁺ T-Zellen kaum Unterschiede (Abb.7). Auffällig war lediglich die schwache Expression von CD122 auf aHP bzw. auf *in vitro* mit Antigen stimulierte CD4⁺ T-Zellen. Dafür zeigten *in vitro* stimulierte CD4⁺ T-Zellen eine verstärkte Expression des IL-7R. Diese unterschiedliche Expression der Rezeptoren für IL-7 und IL-15 auf polyklonalen CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen könnte daran liegen, dass IL-7 eher CD4⁺ T-Zellen beeinflusst und IL-15 eher CD8⁺ T-Zellen.

Für polyklonale CD4⁺ T-Zellen wurde außerdem der frühe Aktivierungsmarker CD69 untersucht. Ein Teil der BLP T-Zellen regulierte diesen Marker hoch, alle anderen Subpopulationen exprimierten CD69 jedoch nicht. Auch Murali-Krishna konnte keine verstärkte Expression von CD69 auf den „Memory-like“ T-Zellen beobachten (Murali-Krishna and Ahmed, 2000).

Die Marker CD45RB und CD5 wurden für die unterschiedlichen Proliferationsarten der CD4⁺ T-Zellen bestimmt, da diese beiden Marker im Autoimmunmodell der Colitisinduktion (vgl. 3.1) eine wichtige Rolle spielen. Im Transfercolitismodell werden meist polyklonale CD4⁺ CD45RB^{hi} T-Zellen verwendet (Powrie et al., 1993). Die CD5-Expression soll zudem aussagekräftig sein für die Affinität einer T-Zelle zum Komplex von self-MHC-self-Peptid, d.h. je höher die CD5-Expression, umso besser können T-Zellen homöostatisch proliferieren (Kassiotis et al., 2003; Kieper et al., 2004). Allerdings konnte bei keiner der untersuchten Populationen eine große Veränderung dieser beiden von Anfang an stark exprimierten Oberflächenmarker detektiert werden.

Wie auch bei den CD8⁺ T-Zellen war das Expressionsmuster von BLP und von antigenstimulierten CD4⁺ T-Zellen nicht identisch. Große Unterschiede waren hier vor allem bezüglich der Rezeptoren für IL-2 (CD25) und IL-7 (CD127) zu verzeichnen, wobei *in vitro* stimulierte CD4⁺ T-Zellen sowohl CD25 als auch CD127 wesentlich stärker exprimierten als die T-Zellen der BLP Fraktion.

Um zu zeigen, dass das Vorhandensein von Vα2-positiven T-Zellen in der P14 TCRtg/RAG2^{-/-} Maus nur die Induktion der aHP beeinflusst, haben wir zusätzlich die Oberflächenmarker von BLP- bzw. NHP- T-Zellen analysiert, die auch nach Transfer in

eine P14 TCRtg/RAG2^{-/-} Maus detektiert werden konnten. Nur die aHP Subpopulation fehlte in diesen Empfängertieren. Unterschiede zwischen NHP oder BLP nach Transfer in der RAG2^{-/-} Maus und NHP oder BLP nach Transfer in der P14 TCRtg/RAG2^{-/-} Empfängermaus waren dabei nicht zu verzeichnen.

Anzumerken ist zudem, dass die in den P14 TCRtg/RAG2^{-/-} Mäusen vorhandenen Vα2-positiven T-Zellen keinerlei Einfluss auf die transferierten T-Zellen nahmen, und diese über den Zeitraum des gesamten Experiments ihren naiven Phänotyp beibehielten, sogar in den Mäusen, welche Colitis entwickelten.

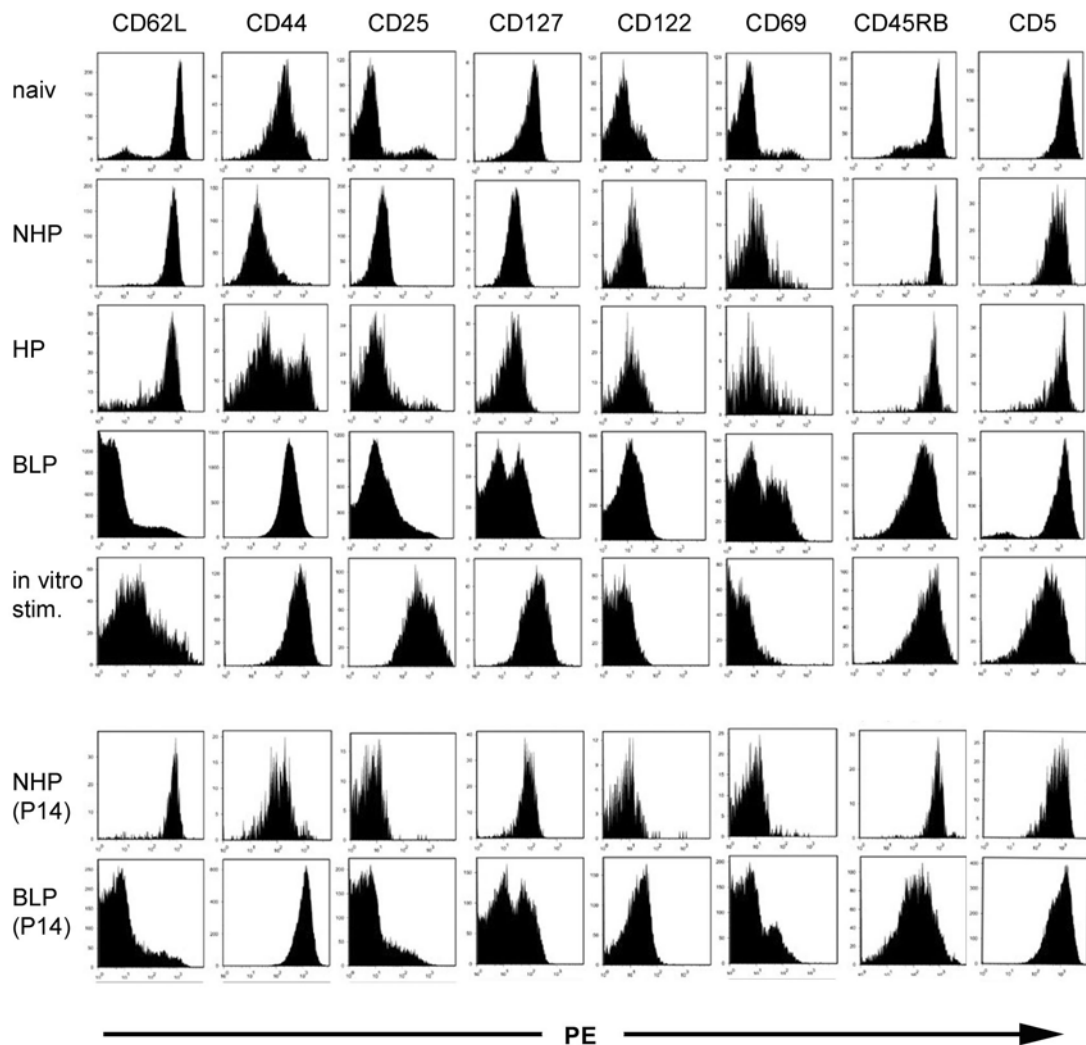


Abbildung 7: Expressionsmuster von Oberflächenmarkern auf aHP und BLP polyklonaler CD4⁺ T-Zellen nach 11 Tagen in lymphopener (bzw. in nicht-lymphopener) Umgebung im Vergleich zu naiven und in vitro stimulierten CD4⁺ polyklonalen T-Zellen

Bei den polyklonalen CD4⁺ T-Zellen wurden jeweils 8×10^6 CFSE-markierte T-Zellen retrobulbär in RAG2^{-/-} Mäuse transferiert. Die Entnahme von Milzen und mLN erfolgte nach 11 Tagen. Einzelzellsuspensionen wurden nach einem Ficollschritt für die FACS-Analyse der angegebenen Oberflächenmarker gefärbt. Entsprechend der Analyse von polyklonalen CD8⁺ T-Zellen, erfolgte die Identifizierung der transferierten T-Zellen über PI, anti-CD3-PE und anti-CD4-APC. PI-negative, anti-CD3-PE und anti-CD4-APC doppelt-positive CD4⁺ LIP T-Zellen wurden als CFSE-Histogramme dargestellt und in BLP, aHP und NHP T-Zellen unterteilt.

Die dargestellten Histogramme zeigen jeweils von oben nach unten angeordnet die Expression eines Oberflächenmarkers für naive, NHP, aHP, BLP und *in vitro* stimulierte CD4⁺ T-Zellen. Zusätzlich sind NHP und BLP CD4⁺ T-Zellen dargestellt, die aus einer nicht-lymphopenen P14 TCRtg RAG2^{-/-} Maus isoliert wurden.

2.3 Microarray-Analysen von LIP CD8⁺ T-Zellen bzw. von aHP 2C T-Zellen

Zusätzlich zur FACS-Analyse des LIP bzw. des aHP Phänotyps wurden sowohl für LIP polyklonale CD8⁺ T-Zellen als auch für monoklonale 2C TCRtg aHP T-Zellen Microarray-Analysen durchgeführt.

Für die Untersuchung der LIP polyklonaler CD8⁺ T-Zellen wurden in drei unabhängigen Experimenten naive, polyklonale CD8⁺ T-Zellen mit CFSE markiert und in je drei RAG2^{-/-} bzw. P14 TCRtg RAG2^{-/-} Mäuse transferiert. Nach fünf Tagen wurden aus Milzen und Lymphknoten sowohl aHP als auch BLP T-Zellen mittels Zellsorting isoliert und für den Transport zu Firma Miltenyi (Bergisch-Gladbach) vorbereitet (vgl. II 2.2.5.4). Zusätzlich wurden Zellproben naiver CD8⁺ T-Zellen sowie repetitiv *in vitro* stimulierte CD8⁺ T-Zellen für die Analyse vorbereitet. Die durchgeführten „PIQOR Immunology Microarrays“ der Firma Miltenyi ergaben jedoch für jede der untersuchten Populationen in den drei verschiedenen Experimenten sehr unterschiedliche Ergebnisse, so dass aktuell noch keine Identifizierung neuer aHP spezifischer Moleküle gelang.

Um eine einheitlichere Zellpopulation zu bearbeiten, wurden in einem weiteren Ansatz monoklonale 2C TCRtg T-Zellen für eine Mikroarray-Analyse verwendet. Der Versuchsansatz entsprach dabei dem der polyklonalen T-Zellen. Nach sechs Tagen erfolgte die Isolierung der aHP Zellen (bzw. der NHP Zellen) aus den Milzen und Lymphknoten der Empfängertiere. Die Proben wurden bei Abgabe dieser Doktorarbeit noch in der Microarray Facility des NKI in Amsterdam bearbeitet.

3. Der Phänotyp von LIP bzw. aHP Memory T-Zellen:

Ein stabiler und transplantabler Phänotyp?

Unsere Ergebnisse bestätigen somit die Daten einer anderen Gruppe, dass naive T-Zellen, die unter lymphopenen Bedingungen proliferieren, einen stabilen Phänotyp entwickeln (Murali-Krishna and Ahmed, 2000). Daraus ergab sich die Frage, ob dieser Phänotyp der aHP-T-Zellen so stabil ist, dass dieser auch nach einem Transfer in eine nicht-lymphopene Umgebung aufrecht erhalten bleibt.

Dazu wurden naive 2C TCRtg T-Zellen zunächst in RAG2^{-/-} Mäuse injiziert, in welchen sie vier Wochen homöostatisch proliferieren konnten. Nach vier Wochen wurden diese aHP 2C T-Zellen im FACS analysiert (Tag 28) und in eine nicht-lymphopene P14 TCRtg/RAG2^{-/-} Maus transferiert. Nach weiteren vier Wochen (Tag 58) erfolgte die FACS-Analyse dieser Zellen bezüglich der wichtigsten Oberflächenmarker für aHP T-Zellen, nämlich CD62L, Ly6C, CD44 und PD-1.

Wir verglichen die Oberflächenmarkerexpression dieser retransferierten T-Zellen (Tag 58) mit der von naiven (Tag 0) und aHP T-Zellen (Tag 28) (Abb.8). Unsere Hypothese vom transplantablen Phänotyp wurde bestätigt, denn die aHP T-Zellen behielten ihren veränderten aHP Phänotyp auch unter nicht-lymphopenen Bedingungen bei. Der aHP Phänotyp besitzt also nach Induktion eine stabile Expression der Oberflächenmarker CD62L^{hi}, CD44^{hi}, Ly6C^{hi} und PD-1^{low}.

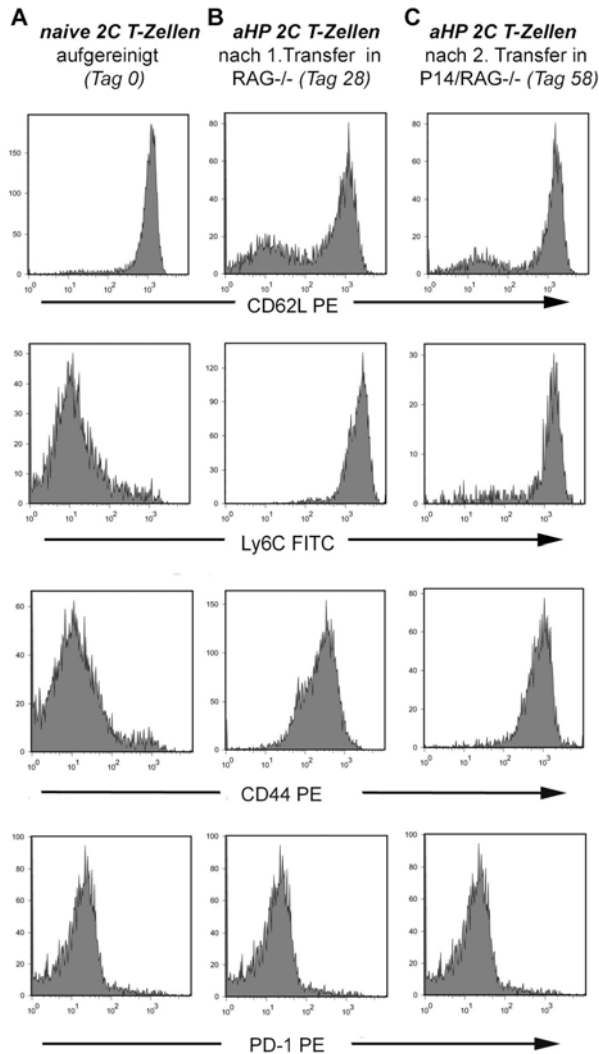


Abbildung 8: aHP T-Zellen behalten die Expression der Oberflächenmarker CD62L, CD44, Ly6C und PD-1 auch nach Transfer in ein nicht-lymphopenes Empfängertier bei

5 x 10^6 aufgereinigte, naive 2C TCRtg T-Zellen wurden retrobulbär in RAG2^{-/-} Mäuse transferriert. Nach vier Wochen aHP wurden diese T-Zellen aus Milz und mLN aufgereinigt und mit anti-1B2-APC und anti-CD62L-PE, anti-CD44-PE, anti-PD-1-PE bzw. anti-Ly6C-FITC gefärbt (Tag 28). Aufgrund der relativ geringen Ausbeute konnten nur noch 1 x 10^6 aHP T-Zellen in eine P14 TCRtg/RAG2^{-/-} Maus transferriert werden.

Nach weiteren vier Wochen wurden Milz und mLN dieser P14 TCRtg/RAG2^{-/-} Maus entnommen, zur Einzelzellsuspension verarbeitet und nach einem ACK-Lyseschritt für die FACS-Analyse vorbereitet.

Dargestellt sind die Expressionsmuster für CD62L, CD44, PD-1 und Ly6C auf PI-negativen, anti-1B2-APC positiven naiven 2C T-Zellen (A), aHP 2C T-Zellen nach vier Wochen unter lymphopenen Bedingungen in der RAG2^{-/-} Maus (B), und schließlich nach einem zweiten Transfer in eine P14 TCRtg/RAG2^{-/-} Maus nach weiteren vier Wochen unter nicht-lymphopenen Bedingungen (C).

Anhand zweier verschiedener Mausmodelle sollte im Folgenden untersucht werden, ob der aHP-Memory Phänotyp nicht nur bezüglich des Phänotyps stabil ist, sondern ob auch dessen mögliche funktionelle Eigenschaften transplantabel sind. Dazu wurde zum einen das Transfercolitismodell verwendet, und zum anderen das 2C Tumormodell.

3.1 Das Transfercolitismodell

Zunächst wurde ein Autoimmunmodell zur Colitisinduktion etabliert. Als Grundlage für dieses Modell diente ein bekanntes Transfercolitismodell, in welchem transferierte CD45RB^{hi} CD4⁺ T-Zellen in SCID und RAG^{-/-} Mäusen eine schwere Colitis induzieren.

Durch die LIP der transferierten naiven T-Zellen wird in der lymphopenen Maus die Selbsttoleranz gebrochen, und es kommt zur Colitisinduktion (Powrie et al., 1993). Um näher an den physiologischen Gegebenheiten zu sein, wurden in unserem Modell anstelle von gesorteten CD45RB^{hi} CD4⁺ T-Zellen, polyklonale, naive CD4⁺ T-Zellen für den Transfer benutzt.

Es ist bekannt, dass regulatorische T-Zellen (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺), welche gleichzeitig oder bis zu zehn Tage nach Transfer von CD45RB^{hi} CD4⁺ T-Zellen verabreicht werden, im Transfermodell eine Colitisinduktion verhindern können (Sakaguchi et al., 1995). In unserem Modell wollten wir jedoch nur die Effekte der Lymphopenie untersuchen, ohne die supprimierende Wirkung von Tregs. Der Vergleich von RAG2^{-/-} mit WT C57BL/6 Mäusen kam daher nicht in Frage.

Bekannt war bereits, dass co-transferierte T-Zellen eine Colitisinduktion durch transferierte CD45RB^{hi} CD4⁺ T-Zellen unterdrücken können, allerdings konnten auch Treg Zellen in dieser co-transferierten T-Zellpopulation enthalten sein (Barthlott et al., 2003; Dummer et al., 2001). Diese Möglichkeit wollten wir für unser Modell umgehen, indem wir anstelle der co-transferierten T-Zellen eine P14 TCRtg RAG2^{-/-} Maus verwendeten, welche bereits mit einer CD8⁺ T-Zellpopulation aufgefüllt ist und sicher keine CD4⁺ regulatorischen T-Zellen besitzt.

Wir konnten bereits zeigen, dass diese P14 T-Zellen in der Lage sind, sowohl die aHP polyklonaler CD8⁺ als auch CD4⁺ T-Zellen zu unterdrücken (Abb.1). Für dieses Modell stellte sich somit zunächst die Frage, ob die bereits in der P14 TCRtg RAG2^{-/-} Maus vorhandenen P14 T-Zellen nicht nur die aHP, sondern auch eine Colitisinduktion durch polyklonale CD4⁺ T-Zellen verhindern können, ähnlich wie dies für die Co-Transferexperimente gezeigt wurde (Barthlott et al., 2003).

3.1.1 P14 TCRtg T-Zellen verhindern eine Colitisinduktion

Zur Beantwortung dieser Frage wurden sowohl RAG2^{-/-} als auch P14 TCRtg/RAG2^{-/-} Mäusen 1 x 10⁶ aufgereinigte, naive CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen injiziert. **Abbildung 9A** repräsentiert den Darmschnitt einer RAG2^{-/-} Maus, in welcher 0,5 x 10⁶ polyklonale CD4⁺ T-Zellen zehn Wochen lang unter lymphopenen Bedingungen proliferieren konnten. **Abbildung 9B** zeigt dagegen einen Schnitt durch den Darm einer P14 TCRtg RAG2^{-/-} Maus, welche ebenfalls 0,5 x 10⁶ aufgereinigte, naive polyklonale CD4⁺ T-Zellen erhielt.

Zehn Wochen nach Zelltransfer zeigte der Darm einer P14 TCRtg RAG2^{-/-} Maus keinerlei Anzeichen für eine Colitis (Abb. 9B), wohl aber der Darm einer RAG2^{-/-} Maus (Abb. 9A). Deutlich ist eine Aufweitung der Krypten erkennbar, T-Zellen sind zwischen die Krypten eingewandert, und auch ein Verlust von Becherzellen war im Darm der RAG2^{-/-} Maus nach zehnwöchiger LIP der CD4⁺ T-Zellen ansatzweise zu beobachten. Infiltrate von CD4⁺-T-Zellen konnten insgesamt in 42 von 45 RAG2^{-/-} Mäusen beobachtet werden, wohingegen 14 von 20 P14 TCRtg/RAG2^{-/-} Mäusen keine eingewanderten T-Zellen im Darm aufwiesen. Tiere die CD8⁺ anstelle von CD4⁺ T-Zellen erhielten, hatten keinerlei Anzeichen für eine Colitisinduktion (nicht gezeigt). Die ungesorteten CD4⁺ T-Zellen lösten in einer lymphopenen Maus eine relativ milde Form von Colitis aus, und so zeigen die RAG2^{-/-} Mäuse in unseren Experimenten zwar die beschriebenen T-Zellinfiltrate, jedoch keinen relevanten Gewichtsverlust (Abb. 9C), wie dies von anderen Gruppen beschrieben wurde, welche gesortete CD4⁺ CD45RB^{hi} T-Zellen verwendeten (Elson et al., 2005; Powrie et al., 1993).

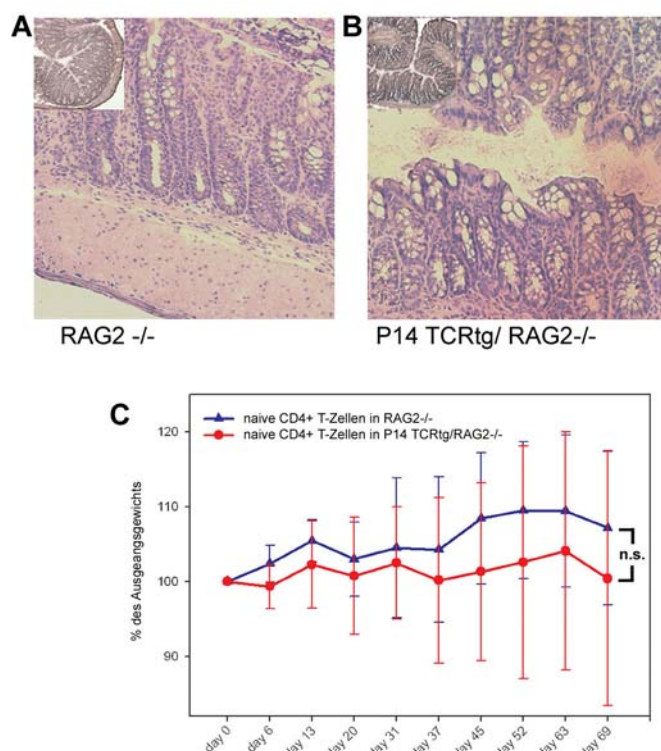


Abbildung 9: Polyklonale CD4⁺ T-Zellen induzieren in der RAG2^{-/-} Maus Colitis, nicht jedoch in der P14 TCRtg/RAG2^{-/-} Maus

0,5 x 10⁶ polyklonale CD4⁺ T-Zellen wurden in jeweils fünf RAG2^{-/-} bzw. P14 TCRtg/RAG2^{-/-} Mäuse injiziert. Nach zehn Wochen wurde der Versuch beendet.

A) und B) Gefrierschnitte des Darms jeder Maus wurden mit Hämatoxylin/Eosin gefärbt und dokumentiert. Gezeigt sind repräsentative Schnitte vom Darm einer RAG2^{-/-} Maus (A) bzw. einer P14 TCRtg/RAG2^{-/-} Maus (B). Die Inserts zeigen jeweils Darmschnitte von Tieren, welche nur PBS gespritzt bekamen.

C) Zusätzlich wurde das Gewicht der Mäuse wöchentlich dokumentiert. Mittelwerte ± Standardabweichung sind gezeigt. Die hohen Abweichungen resultieren aus dem unterschiedlichen Alter der eingesetzten Mäuse.

3.1.2 Die Colitisinduktion wird durch aHP polyklonaler CD4⁺ T-Zellen vermittelt

Unser Modell ermöglicht eine Aussage darüber, ob die aHP oder die BLP von CD4⁺ polyklonalen T-Zellen für die Colitisinduktion verantwortlich ist, da in der RAG2^{-/-} Maus aHP und BLP auftreten können, in der nicht-lymphopenen P14 TCRtg/RAG2^{-/-} Maus dagegen nur BLP (Abb. 1E und 1F). Da die BLP sowohl in RAG2^{-/-} als auch in P14 TCRtg/RAG2^{-/-} Mäusen auftritt, die Colitisinduktion jedoch vornehmlich auf RAG2^{-/-} Mäuse beschränkt war, scheint die BLP redundant für die Colitisinduktion zu sein (Abb. 9).

3.1.3 Transfer von LIP T-Zellen induziert auch in nicht-lymphopener Maus Colitis

Anschließend sollte der eigentlichen Frage nachgegangen werden, ob neben den phänotypischen Eigenschaften auch die funktionellen Eigenschaften von LIP CD4⁺ T-Zellen in einen nicht-lymphopenen Empfänger transferiert werden können. In diesem Fall wäre dies die Fähigkeit der LIP T-Zellen, auch in einem nicht-lymphopenen Empfänger eine Colitis zu induzieren, nachdem diese T-Zellen im Zuge einer vorangegangenen LIP bereits in einer RAG2^{-/-} Maus eine Colitis induziert haben.

In der Tat konnte ich zeigen, dass transferierte CD4⁺ LIP T-Zellen sowohl in einer lymphopenen RAG2^{-/-} Maus als auch in einer nicht-lymphopenen P14 TCRtg/RAG2^{-/-} Maus eine Colitis induzieren. So wurden in neun von elf P14 TCRtg/RAG2^{-/-} Mäusen nach LIP-Transfer massive T-Zellinfiltrationen beobachtet, verbunden mit einer starken Schädigung des Darmgewebes (Abb. 10C). P14 TCRtg/RAG2^{-/-} Mäuse, welchen naive CD4⁺ T-Zellen transferiert wurden, zeigten dagegen keine T-Zellinfiltrate im Colon (Abb. 10B). Im Einklang mit diesen Beobachtungen zeigten P14 TCRtg/RAG2^{-/-} Mäuse nach LIP T-Zellinjektion einen deutlichen Gewichtsverlust (Abb. 10A).

Auch RAG2^{-/-} Mäuse wiesen nach Transfer von LIP T-Zellen T-Zellinfiltrate im Colon auf (Abb. 10D), die jedoch überraschenderweise weniger stark ausgeprägt waren, als in den P14 TCRtg/RAG2^{-/-} Mäusen (Abb. 10C). Zudem verloren die RAG2^{-/-} Mäuse im Gegensatz zu den P14 TCRtg/RAG2^{-/-} Mäusen nach Transfer von LIP T-Zellen nicht an Gewicht (Daten nicht gezeigt).

Unsere Daten legen nahe, dass die aHP nur für die Induktion der Colitis im lymphopenen Empfänger nötig ist. Somit sind neben den phänotypischen auch funktionelle Eigenschaften der LIP T-Zellen transplantabel.

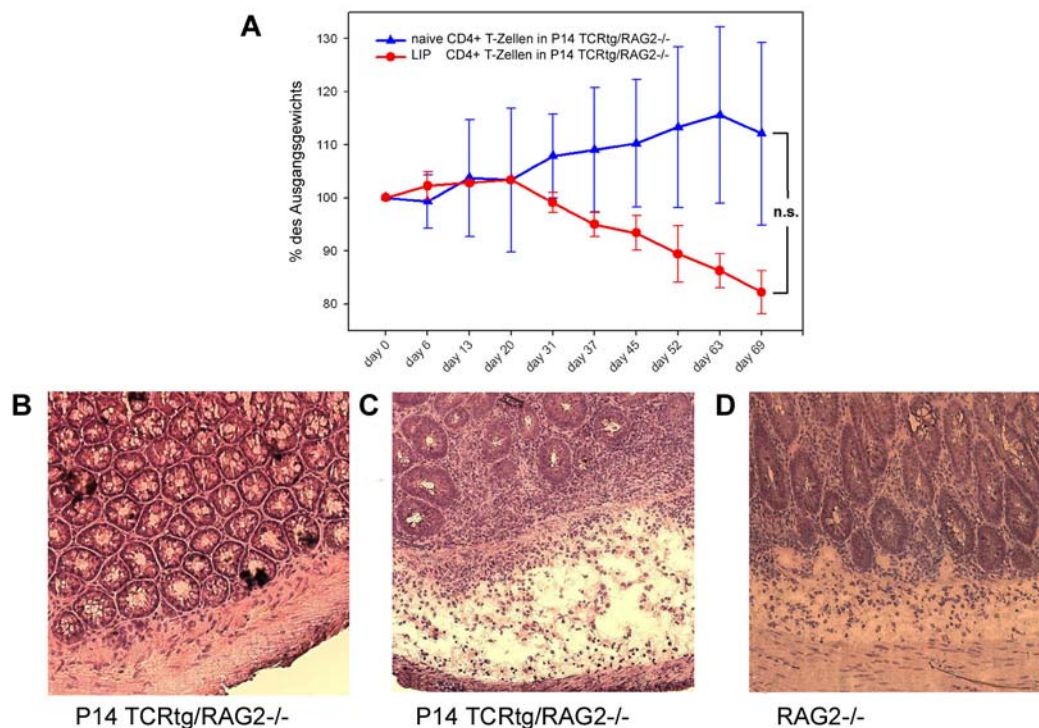


Abbildung 10: LIP CD4⁺ T-Zellen induzieren auch in der P14 TCRtg/RAG2^{-/-} Maus Colitis

0,5 x 10⁶ polyklonale, naive bzw. 0,5 x 10⁶ LIP CD4⁺ T-Zellen (aufgereinigt aus RAG2^{-/-} Mäusen nach acht Wochen LIP unter lymphopenen Bedingungen) wurden in je fünf P14 TCRtg/RAG2^{-/-} Mäuse und in je fünf RAG2^{-/-} Mäuse injiziert. Nach zehn Wochen wurde der Versuch beendet.

A) Das Gewicht der Mäuse wurde wöchentlich dokumentiert. Mittelwerte \pm Standardabweichung sind gezeigt. Die hohen Abweichungen der Gewichtsverläufe in der Gruppe der P14 TCRtg/RAG2^{-/-} Mäuse, welche naive CD4⁺ T-Zellen erhielten, resultieren aus dem unterschiedlichen Alter der eingesetzten Mäuse.

B-D) Gefrierschnitte des Darms jeder Maus wurden mit Hämatoxylin/Eosin gefärbt und dokumentiert. Gezeigt sind repräsentative Darmschnitte von P14 TCRtg/RAG2^{-/-} Mäusen, transferiert mit naiven T-Zellen (B) bzw. mit LIP T-Zellen (zweiter Transfer) (C). Abbildung (D) zeigt einen repräsentativen Darmschnitt einer RAG2^{-/-} Maus, acht Wochen nach Transfer mit LIP T-Zellen (= zweiter Transfer).

3.1.4 LIP macht T-Zellen unabhängig von Co-Stimulation via CD28:

Charakterisierung von LIP T-Zellen in vitro

Um die teilweise nicht erwarteten funktionellen Ergebnisse weiter zu charakterisieren, wurde die Zytokinproduktion dieser T-Zellen untersucht. Dazu wurden CD4⁺ T-Zellen aus Milz sowie mLN von RAG2^{-/-} bzw. von P14 TCRtg/RAG2^{-/-} Mäusen acht Wochen nach T-Zelltransfer aufgereinigt. Bei den aufgereinigten T-Zellpopulationen handelte es sich allerdings um Mischpopulationen, da nach acht Wochen eine Unterteilung der LIP-

Population anhand unterschiedlicher CFSE-Intensitäten in aHP, BLP und NHP T-Zellen nicht mehr möglich war. Die LIP-Population, welche aus der RAG2^{-/-} Maus isoliert wurde, bestand aus BLP, aHP und NHP T-Zellen bzw. im Falle der P14 TCRtg/RAG2^{-/-} Maus nur aus BLP und NHP- T-Zellen. Diese Mischpopulationen wurden bei den *in vitro* Versuchen eingesetzt.

Mittels ELISA wurde die IL-2 Produktion der CD4⁺ LIP T-Zellpopulationen aus der RAG2^{-/-} und aus der P14 TCRtg/RAG2^{-/-} Maus miteinander verglichen. Gegenüber naiven CD4⁺ T-Zellen zeigte sich dabei, dass die LIP T-Zellen aus der RAG2^{-/-} Maus erwartungsgemäß mehr IL-2 produzierten als die naiven T-Zellen (Abb. 11a im Vergleich zu 11b). Im Gegensatz zu naiven T-Zellen, welche ohne Co-Stimulation kein IL-2 produzierten, lieferten LIP T-Zellen mit und ohne anti-CD28 Stimulation nahezu vergleichbare Mengen an IL-2 (Abb. 11a im Vgl. zu 11b). Auch CD4⁺ T-Zellen aus P14 TCRtg/RAG2^{-/-} Mäusen produzierten nach anti-CD3/anti-CD28 Stimulation mehr IL-2 als naive T-Zellen (Abb. 11a im Vgl. zu 11c). Auf eine Stimulation mit anti-CD3 allein, antworteten diese Zellen allerdings weniger stark als LIP T-Zellen aus der RAG2^{-/-} Maus (Abb. 11b im Vgl. zu 11c).

Neben den bereits beschriebenen Veränderungen im Phänotyp führte die LIP also auch zur Unabhängigkeit der T-Zellen von einer Co-Stimulation via CD28. Auch die IL-2 Produktion der re-transferierten T-Zellen bestätigte sowohl für die LIP T-Zellen aus den P14 TCRtg/RAG2^{-/-} als auch für die LIP T-Zellen aus RAG2^{-/-} Mäusen (Abb. 11d und 11e) eine vollständige Unabhängigkeit der T-Zellen von der Co-Stimulation durch CD28.

Die CD4⁺ Population aus dem Re-Transfer in P14 TCRtg/RAG2^{-/-} Mäuse produzierte in Korrelation mit der stärkeren Pathologie auch mehr IL-2 als T-Zellen nach dem ersten Transfer (Abb. 11d im Vgl. zu 11c). Zudem waren diese T-Zellen vollkommen CD28-unabhängig. Interessanterweise lieferten dagegen re-transferierte LIP T-Zellen aus einer RAG2^{-/-} Maus nur IL-2 Mengen, die denen eines ersten Transfers entsprachen, wobei auch die re-transferierten LIP T-Zellen aus der RAG2^{-/-} Maus vollkommen unabhängig von der Costimulation via CD28 waren (Abb. 11e im Vgl. zu 11b). Eine mögliche Erklärung für diese Unterschiede der LIP-Zellen nach Re-Transfer in eine P14 TCRtg/RAG2^{-/-} oder eine RAG2^{-/-} Maus ist eine Art activation induced non-responsiveness (AINR) von CD4⁺ T-Zellen, wie sie bislang nur für CD8⁺ T-Zellen beschrieben wurde (Tham and Mescher, 2002). Diese AINR könnte durch eine viel stärkere Aktivierung der transferierten LIP T-Zellen entstehen, wenn diese erneut in einen lymphopenen Empfänger gebracht werden.

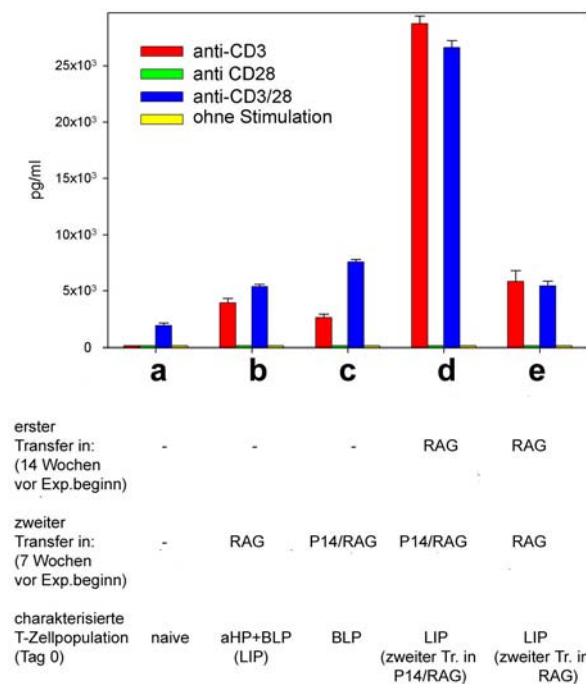


Abbildung 11: LIP T-Zellen werden unter lymphopenen Bedingungen unabhängig von der Co-Stimulation durch CD28

Ca. 100.000 T-Zellen wurden in einer 96-well Zellkulturplatte inkubiert, welche zuvor mit anti-CD3 \pm anti-CD28 mAK beschichtet wurde. Nach 18 Stunden wurde vom Überstand jedes wells eine Probe genommen, und mittels ELISA die IL-2 Konzentration bestimmt.

Dargestellt ist die Produktion von IL-2 von

a,b,c) 5×10^4 $CD4^+$ naiven oder LIP T-Zellen, isoliert aus RAG2^{-/-} bzw. P14 TCRtg/RAG2^{-/-} Mäusen (nach einmaligem Transfer)

d,e) 5×10^4 $CD4^+$ LIP T-Zellen isoliert aus RAG2^{-/-} bzw. P14 TCRtg/RAG2^{-/-} (nach zweimaligem Transfer).

3.1.5 LIP T-Zellen können durch Treg supprimiert werden

3.1.5.1 LIP $CD4^+$ T-Zellen proliferieren in einer Wildtypmaus nicht

Wie unter 1.1 und 1.2 beschrieben, zeigten naive transferierte T-Zellen sowohl im chronisch-lymphopenen RAG2^{-/-} Modell als auch unter akut-lymphopenen Bedingungen in einer bestrahlten C57BL/6 Maus eine vergleichbare Proliferation. Die aHP dieser T-Zellen konnte sowohl durch einen transgenen T-Zellklon in der P14 TCRtg RAG2^{-/-} Maus unterdrückt werden, als auch durch den in einer Wildtypmaus vorhandenen polyklonalen Lymphozytenpool (Abb. 1 und 2). Auch RAG2^{-/-} Mäuse, welche durch eine Knochenmarkstransplantation von C57BL/6 Wildtypmäusen einen aufgefüllten T-Zellpool besitzen, zeigen nach Transfer von T-Zellen weder aHP noch BLP (Kieper et al., 2005).

Allerdings konnte der $CD8^+$ transgene T-Zellklon der P14 TCRtg RAG2^{-/-} Maus eine Colitisinduktion nach Transfer von LIP T-Zellen nicht unterdrücken (Abb. 10C). Deshalb stellte sich die Frage, ob LIP T-Zellen durch die Anwesenheit einer polyklonalen Population von T-Zellen in einer Wildtypmaus, welche Tregs im T-Zellpool besitzen, supprimiert werden können.

Hierzu wurden sowohl naive, CFSE-markierte $CD4^+$ T-Zellen als auch CFSE-markierte LIP $CD4^+$ T-Zellen in C57BL/6 Mäuse transferiert. Es zeigte sich, dass die LIP $CD4^+$

T-Zellen in einer Wildtypmaus ebenso wie die naiven T-Zellen weder akut homöostatisch noch Burst-like proliferieren konnten. Der ursprüngliche CFSE-Gehalt beider transferierter Zellpopulationen blieb 12 Tage lang konstant (Abb. 12A und B). Treg hemmen somit nicht nur naive sondern auch LIP $CD4^+$ T-Zellen an der Proliferation.

Auch die funktionellen Effekte der LIP wurden in Wildtypmäusen gehemmt. Ein weiterer Transferversuch von naiven bzw. LIP $CD4^+$ T-Zellen in Wildtypmäuse zeigte, dass keine der beiden Mausgruppen Anzeichen für eine Colitisinduktion wie T-Zellinfiltrate, Gewebeschädigung oder Gewichtsverlust aufwies (Abb. 12C-12F).

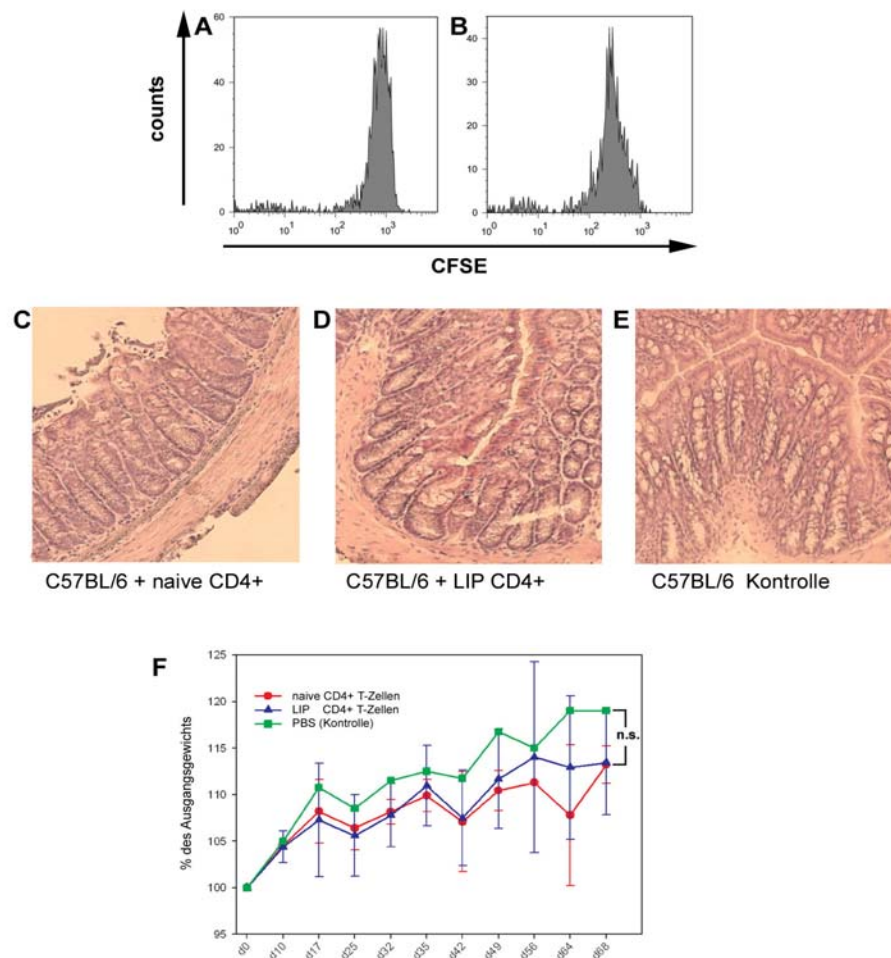


Abbildung 12: LIP $CD4^+$ T-Zellen können in C57BL/6 Wildtypmäusen weder proliferieren noch Colitis induzieren.

A, B) 4×10^6 naive bzw. LIP $CD4^+$ T-Zellen von congenen Ly5.1 C57BL/6 Mäusen wurden mit CFSE markiert und in jeweils fünf Wildtypmäuse transferiert. Die Zellen wurden aus Milz und mLN der Mäuse nach 12 Tagen isoliert. Die PI-negativen, anti- $CD4$ -APC und anti-Ly5.1-PE doppelt positiven Zellen wurden auf ihren CFSE-Gehalt hin untersucht. Die Histogrammdarstellungen für CFSE zeigen, dass weder naive (A) noch LIP T-Zellen (B) nach Transfer in eine Wildtypmaus proliferieren können.

C,D,E) $0,5 \times 10^6$ polyklonale, naive bzw. $0,5 \times 10^6$ LIP $CD4^+$ T-Zellen (aufgereinigt aus RAG2^{-/-} Mäusen nach acht Wochen LIP) wurden in jeweils fünf Wildtypmäuse injiziert. Nach zehn Wochen wurde der Versuch beendet.

Gezeigt sind repräsentative H/E gefärbte Gefrierschnitte von Wildtypmäusen, welche naive (C) bzw. LIP T-Zellen (D) erhielten, oder zur Kontrolle nur PBS (E).

F) Auch das Gewicht der Mäuse wurde wöchentlich dokumentiert. Mittelwerte \pm Standardabweichung sind gezeigt.

3.1.5.2 Co-Transfer von Treg inhibiert Colitisinduktion durch LIP T-Zellen in nicht-lymphopener Maus

In früheren Veröffentlichungen wurde beschrieben, dass nur ein ausreichend komplexes T-Zellrepertoire, wie es z.B. für eine Wildtypmaus typisch ist, die LIP von transferierten T-Zellen unterdrücken kann, wohingegen ein einzelner T-Zellklon die LIP transferierter T-Zellen nicht hemmt (Min et al., 2004). Dennoch zeigen unsere Daten, dass ein einzelner P14 T-Zellklon die aHP naiver T-Zellen erfolgreich unterdrücken konnte, und gleichzeitig auch die Induktion einer Colitis verhinderte. LIP T-Zellen dagegen konnten von diesem Klon jedoch nicht mehr reguliert werden. Der Transfer von LIP T-Zellen in C57BL/6 Mäuse legte nahe, dass LIP T-Zellen aber noch durch Treg moduliert werden konnten.

Um dies zu beweisen wurden aufgereinigte LIP CD4⁺ T-Zellen aus der RAG2^{-/-} Maus im Verhältnis 1 : 1 mit regulatorischen T-Zellen aus der C57BL/6 Maus co-transferiert. Zur Kontrolle wurden Tregs alleine, bzw. LIP T-Zellen mit CD4⁺ CD25^{neg} T-Zellen im Verhältnis 1 : 1 (co-)transferiert. Erfolgte ein Co-Transfer von Treg Zellen, so verursachten die LIP T-Zellen weder Gewichtsverlust (Abb. 13A) noch T-Zellinfiltrate (Abb. 13B). Ein Co-Transfer von CD4⁺ CD25^{neg} Kontroll T-Zellen konnte die Induktion der Colitis durch LIP T-Zellen jedoch nicht unterdrücken (Abb. 13A, C). Der Transfer von regulatorischen T-Zellen ohne Effektorzellen führte zu keinerlei Infiltration bzw. Gewichtsverlust (Abb. 13A und D)

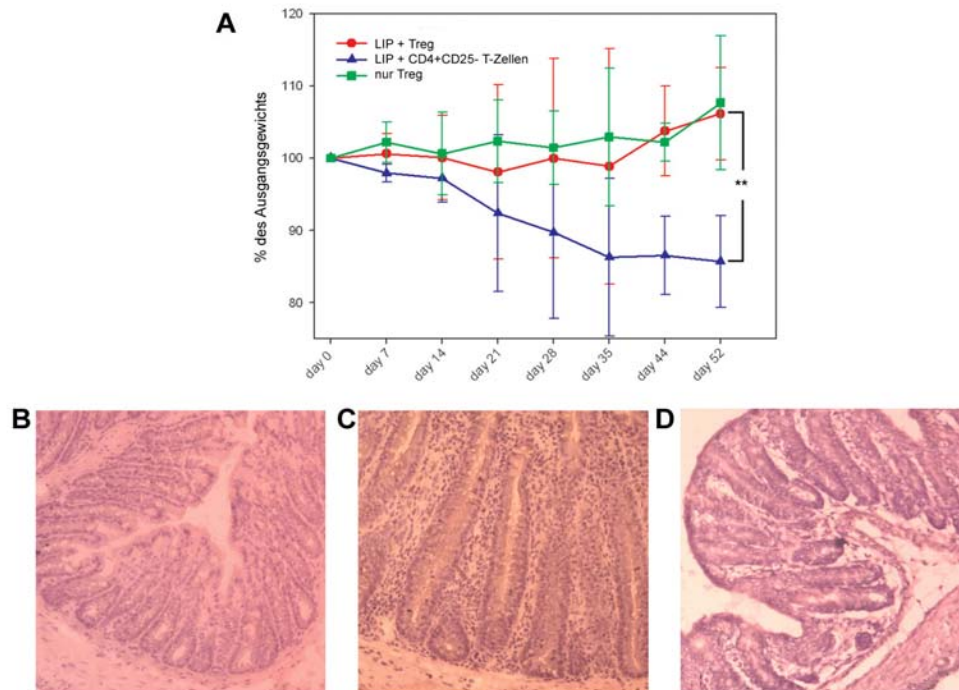
Somit können also Treg nicht nur naive CD4⁺ T-Zellen regulieren, sondern auch LIP T-Zellen. Ein komplexes TCR Repertoire ist für die Regulation der CD4⁺ LIP T-Zellen allerdings nicht nötig.

Abbildung 13: Der Co-Transfer von regulatorischen T-Zellen kann die Colitisinduktion durch LIP T-Zellen in P14 TCRtg/RAG2^{-/-} Mäusen verhindern

Je fünf P14 TCRtg/RAG2^{-/-} Mäuse wurden jeweils 0,5 x 10⁶ LIP CD4⁺ T-Zellen + 0,5 x 10⁶ Treg, 0,5 x 10⁶ LIP CD4⁺ T-Zellen + CD4⁺CD25^{neg} T-Zellen oder nur 0,5 x 10⁶ Treg injiziert. Der Versuch wurde nach acht Wochen beendet.

A) Das Gewicht der Mäuse wurde wöchentlich dokumentiert. Mittelwerte \pm Standardabweichung sind gezeigt. Die mit ** gekennzeichneten Werte können als statistisch signifikant betrachtet werden.

B,C,D) Gefrierschnitte des Darms jeder Maus wurden mit Hämatoxylin/Eosin gefärbt und dokumentiert. Gezeigt sind repräsentative Darmschnitte von P14 TCRtg/RAG2^{-/-} Mäusen transferiert mit LIP T-Zellen und co-transferierten Treg (B), mit LIP T-Zellen und co-transferierten CD4⁺CD25^{neg} T-Zellen (C) bzw. nur mit Treg Zellen (D).



3.1.5.3 Treg expandieren in gleichem Maß wie LIP $CD4^+$ T-Zellen

Der Pool von nicht gesorteten $CD4^+$ naiven T-Zellen enthielt ca. zehn Prozent $CD45RB^{\text{low}}$ T-Zellen (Abb. 14A), von welchen ca. 8,5 Prozent regulatorische T-Zellen waren (Abb. 14B). Die übrigen ein bis zwei Prozent der $CD45RB^{\text{low}}$ T-Zellen stellen wahrscheinlich aktivierte T-Zellen dar. Daher sollte geklärt werden, warum diese in der transferierten T-Zellpopulation vorhandenen Treg T-Zellen nicht die Induktion einer Colitis unterdrücken konnten. Wir spekulierten, dass Treg im lymphopenen Empfänger nicht schnell genug proliferieren konnten, und dadurch während der LIP eventuell von anderen $CD4^+$ T-Zellen überwachsen wurden, oder aber, dass die Anzahl der Treg trotz LIP nicht groß genug war, um eine Colitisinduktion zu verhindern.

Die erste Vermutung konnte jedoch durch das folgende Experiment ausgeschlossen werden: Mittels einer FACS-Analyse konnten wir zeigen, dass der Prozentsatz der regulatorischen T-Zellen ($CD4^+CD25^+FoxP3^+$) in einer Wildtypmaus vor und nach einer dreiwöchigen LIP konstant bei ca. 8 Prozent der $CD4^+$ T-Zellen lag. Die Treg wurden also nicht von anderen $CD4^+$ T-Zellen überwachsen, sondern proliferierten selbst unter lymphopenen Bedingungen (Abb. 14B und C). Daher war wahrscheinlich der Anteil an Treg in der transferierten Population zu gering, um eine Colitisinduktion zu verhindern.

Für unsere Co-Transfereexperimente wurden polyklonale $CD4^+$ T-Zellen und Treg im Verhältnis 1 : 1 eingesetzt. Ab welchem Verhältnis von naiven $CD4^+$ T-Zellen zu Treg eine Colitisinduktion nach Transfer in einen lymphopenen Empfänger unterdrückt wird, muss mittels Titration des Verhältnisses von naiven zu Treg Zellen noch untersucht werden.

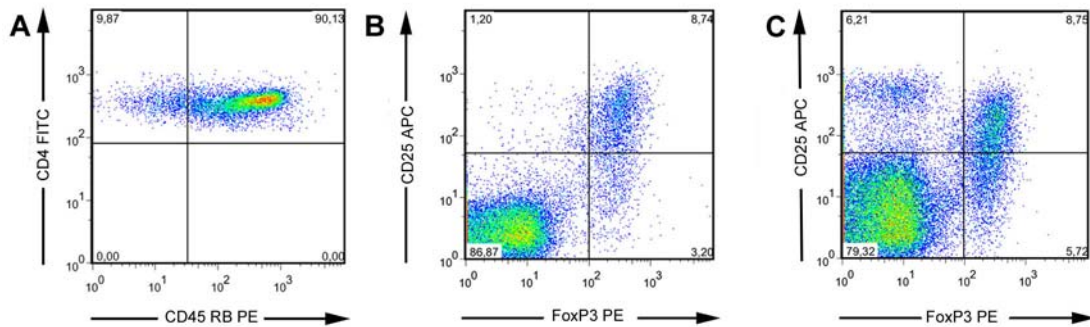


Abbildung 14: Der Prozentsatz von Treg innerhalb der $CD4^+$ T-Zellpopulation liegt vor und nach Transfer in einen lymphopenen Empfänger konstant bei acht Prozent

A, B) Aufgereinigte naive polyklonale $CD4^+$ T-Zellen wurden im FACS analysiert, um den Prozentsatz von $CD4^+CD45RB^{low}$ T-Zellen (A) bzw. von $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ regulatorischen T-Zellen (B) zu bestimmen. Die Zellen wurden für (A) mit anti-CD4-APC und anti-CD45RB-PE gefärbt und als Dotplot dargestellt, für (B) mit anti-CD4-FITC, anti-CD25-APC und intrazellulär mit anti-FoxP3-PE.

C) $0,5 \times 10^6$ dieser aufgereinigten, naiven $CD4^+$ T-Zellen wurden retrobulbär in 100 μ l PBS in $RAG2^{-/-}$ Mäuse injiziert und nach drei Wochen als LIP T-Zellen erneut für anti-CD4-FITC, anti-CD25-APC und intrazellulär mit anti-FoxP3-PE gefärbt. Die CD25- und FoxP3-positiven T-Zellen innerhalb der $CD4^+$ T-Zellpopulation stellen den Prozentsatz von Treg vor (B) bzw. nach drei Wochen in einer lymphopenen Maus dar (C).

3.2 Das 2C Tumormodell

Im Autoimmunmodell erlangen naive $CD4^+$ polyklonale T-Zellen durch die LIP in einer $RAG2^{-/-}$ Maus neue Eigenschaften wie z.B. die Unabhängigkeit von der Co-Stimulation durch CD28. Diese sind so stabil, dass sie auch nach Transfer in einen nicht-lymphopenen Empfänger aufrechterhalten werden. Der entstandene Phänotyp scheint also von der Lymphopenie entkoppelbar zu sein, sobald er einmal etabliert ist. Das Hauptinteresse unserer Arbeitsgruppe ist aber nicht die Induktion einer Autoimmunerkrankung, sondern eine verbesserte Tumorkontrolle beim adoptiven T-Zelltransfer (ACT). Wir untersuchten daher die Stabilität von LIP Funktionen in unserem 2C Tumormodell. Wie bereits in der Einleitung angesprochen, ist das Überwinden der Toleranz im Rahmen von

Tumorthapien erwünscht. Hier will man – im Gegensatz zur Transfercolitis – gezielt Autoimmunität erzeugen.

Bekannt ist für das 2C Tumormodell, dass naive 2C TCRtg T-Zellen in einem lymphopenen Empfänger akut homöostatisch proliferieren und dabei das Wachstum des allogenen Tumors HTR.c kontrollieren. Der HTR.c-Tumor wächst jedoch in der Regel aus, wenn die naiven T-Zellen auf den Tumor in einer nicht-lymphopenen P14 TCRtg/RAG2^{-/-} Maus treffen. Dabei handelt es sich um einen qualitativen und nicht um einen quantitativen Effekt, da die Wirksamkeit der 2C TCRtg T-Zellen auch nicht durch den Transfer der hundertfachen Menge an 2C TCRtg T-Zellen verbessert wird (Brown et al., 2006).

Neben der beschriebenen phänotypischen Veränderung der 2C TCRtg T-Zellen hin zu einem aHP Phänotyp, konnte mittels *in vitro* Versuchen auch gezeigt werden, dass aHP 2C TCRtg T-Zellen funktionelle Eigenschaften entwickeln, die denen von antigenaktivierten T-Zellen ähnlich sind. So können diese Zellen ihre spezifischen Zielzellen *in vitro* besser lysieren als naive T-Zellen, und auch die IFN γ -Produktion gleicht eher der von aktivierten als von naiven T-Zellen (Murali-Krishna and Ahmed, 2000).

In Anlehnung an die beobachtete Übertragbarkeit der funktionellen Eigenschaften im Transfercolitismodell, stellte sich deshalb die Frage, ob auch aHP 2C T-Zellen ihre erworbenen Eigenschaften beibehalten können bzw. ob diese von der Lymphopenie entkoppelt werden können. Können 2C aHP T-Zellen nach Transfer in die nicht-lymphopene P14 TCRtg/RAG2^{-/-} einen HTR.c Tumor abstoßen? Findet also auch im 2C Tumormodell nach der Induktion des Phänotyps eine Entkopplung von der ursprünglich benötigten Lymphopenie statt?

Hierzu wurden sowohl RAG2^{-/-} als auch P14 TCRtg/RAG2^{-/-} Mäusen 1 x 10⁶ HTR.c Tumorzellen subkutan in die Flanke appliziert. Drei Tage später folgte die retrobulbäre Injektion von je 1 x 10⁶ naiven 2C TCRtg T-Zellen. Diese werden verglichen mit 2C TCRtg T-Zellen, die zwei Wochen in RAG2^{-/-} Mäusen proliferiert haben (aHP T-Zellen), oder über zwei Wochen *in vitro* stimuliert wurden.

Wie auch andere Gruppen gezeigt haben, konnten die naiven 2C TCRtg T-Zellen unter lymphopenen Bedingungen den Tumor nach ca. 30 Tagen abstoßen, wohingegen die Kontrollmäuse, welchen nur PBS gespritzt wurde, das Tumorstadium nicht kontrollierten. Die *in vitro* stimulierten 2C TCRtg T-Zellen konnten ein Auswachsen des Tumors nach anfänglicher Kontrolle nicht verhindern. aHP 2C T-Zellen dagegen kontrollierten das Tumorstadium in der RAG2^{-/-} Maus ähnlich wie naive 2C T-Zellen und bestätigten damit unsere Hypothese (Abb. 15A).

In nicht-lymphopenen P14 TCRtg/RAG2^{-/-} Empfängertieren konnten *in vitro* stimulierte 2C TCRtg T-Zellen ein Tumorwachstum nicht verhindern. aHP 2C TCRtg T-Zellen waren dagegen auch unter nicht-lymphopenen Bedingungen in der Lage, einen Tumor innerhalb von ca. 25 Tagen abzustößen (Abb. 15B).

Die Hypothese eines transplantablen Phänotyps von aHP 2C TCRtg bzw. LIP CD4⁺ T-Zellen konnte also sowohl im 2C-Tumormodell als auch im Transfercolitismodell bestätigt werden.

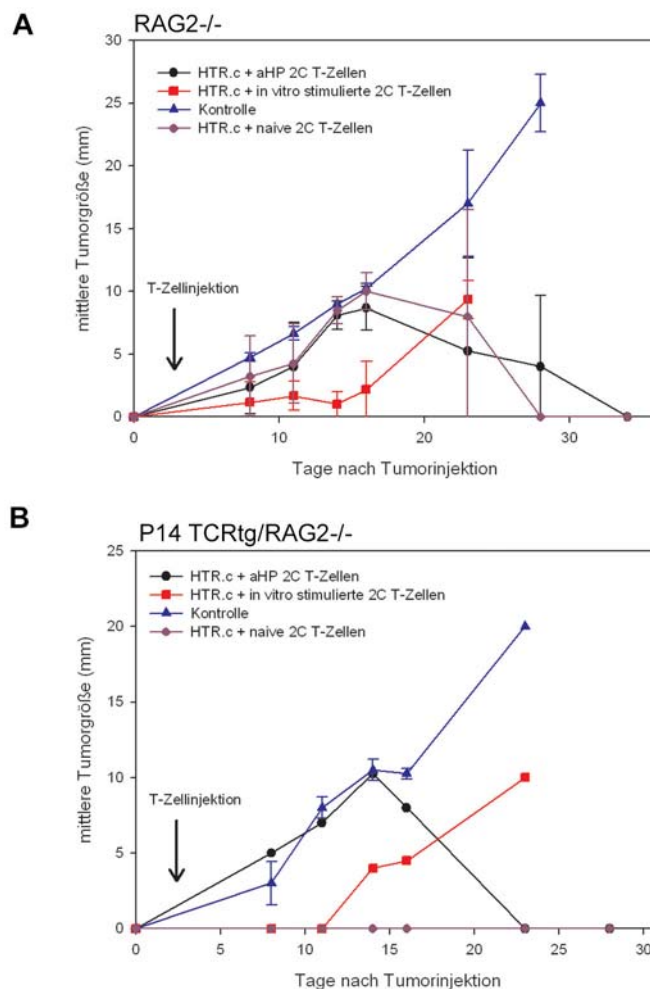


Abbildung 15: aHP 2C T-Zellen können das Tumorwachstum auch unter nicht-lymphopenen Bedingungen kontrollieren

Zwei Wochen vor Versuchsbeginn wurden vier RAG2^{-/-} Mäusen 5 x 10⁶ naive 2C TCRtg T-Zellen injiziert. Parallel wurden naive 2C T-Zellen mit P815.B7.1 Tumorzellen *in vitro* repetitiv stimuliert. An Tag -3 wurden RAG2^{-/-} bzw. P14 TCRtg/RAG2^{-/-} Mäusen 1 x 10⁶ HTR.c Tumorzellen subkutan in die Flanke appliziert. An Tag 0 erfolgte die Aufreinigung von naiven und aHP 2C T-Zellen aus der Milz bzw. aus Milz und mLN, sowie das Abernten der *in vitro* stimulierten 2C T-Zellen. Jeweils 1 x 10⁶ naive, aHP oder *in vitro* stimulierte 2C T-Zellen wurden in Gruppen von je 2 RAG2^{-/-} bzw. 2 P14 TCRtg/RAG2^{-/-} Mäusen transferiert.

Das Tumorwachstum wurde zweimal pro Woche kontrolliert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung für RAG2^{-/-} Mäuse (A) bzw. P14 TCRtg/RAG2^{-/-} Mäuse (B). Der Versuch musste für die Gruppe der RAG2^{-/-} Mäuse vorzeitig beendet werden, da sich die Tumoren in die Körperhöhle der Tiere ausgebreitet hatten. Zudem fehlt in Abbildung 15B die Gruppe der Mäuse, welcher naive 2C T-Zellen transferiert wurden, da in diesen beiden Mäusen die Tumoren nicht anwuchsen.

4. Funktionell relevante Moleküle für die aHP

Da der Phänotyp unter lymphopenen Bedingungen stabil bleibt, und zudem auch nach Transfer in eine nicht-lymphopene Umgebung aufrecht erhalten wird (Abb. 8), stellte sich die Frage, ob die Expression bestimmter Oberflächenmoleküle auf aHP T-Zellen auch von funktioneller Relevanz für die aHP ist. Im Vergleich zu einer *in vitro* Stimulation mit Antigen war zum einen die konstante Expression des CD62L Moleküls besonders auffällig, und zum anderen, dass die meisten aHP 2C T-Zellen negativ für PD-1 blieben (Abb. 4). Nur eine kleine Population der aHP 2C T-Zellen, welche besonders stark proliferierte, zeigte eine verstärkte PD-1-Expression.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden diese beiden Oberflächenmoleküle bezüglich ihrer funktionellen Relevanz für die aHP untersucht.

4.1 Funktioneller Einfluss von CD62L auf die Homöostatische Proliferation

L-Selektin ist äußerst wichtig, damit naive T-Lymphozyten aus der Blutbahn in sekundäre Lymphorgane einwandern können und um dort mit DCs und somit mit Fremdanigen in Kontakt zu kommen. Das Adhäsionsmolekül CD62L spielt dabei als „Homingfaktor“ in einem ersten Schritt einer dreiteiligen Homing-Kaskade, bestehend aus „Rollen“, „Festhalten“ und „Anheften“ der T-Zellen an der Endothelwand, eine entscheidende Rolle. Für mich stellten sich deshalb folgende Fragen: Inwiefern steht diese Homing-Funktion von CD62L in Zusammenhang mit der aHP naiver T-Zellen? Wie wichtig sind die sekundären Lymphorgane und v.a. die peripheren Lymphknoten für die Induktion der aHP naiver T-Zellen? Kann eine Aussage getroffen werden, an welchem Ort die aHP stattfindet?

4.1.1 L-Selektin defiziente T-Zellen zeigen verlangsamte aHP

4.1.1.1 Vergleich der T-Zellen von C57BL/6 und C57BL/6 CD62L^{-/-} Mäusen

Zunächst sollte der Einfluss des Moleküls CD62L auf die aHP von CD8⁺ polyklonalen T-Zellen untersucht werden. Neben C57BL/6 Wildtypmäusen (=WT) wurden dazu CD62L^{-/-} C57BL/6 (=CD62L^{-/-}) Mäuse verwendet (Arbones et al., 1994). Um auszuschließen, dass sich die T-Zellen dieser beiden Mausstämme außer in ihrer CD62L-Expression noch in weiteren Merkmalen unterscheiden, wurde ein Vergleich der Expression von Oberflächenmarkern auf naiven bzw. *in vitro* stimulierten T-Zellen durchgeführt. Zudem wurde das Muster der TCR V β Verteilung bei WT und bei CD62L^{-/-} CD8⁺ T-Zellen bestimmt (vgl. II 2.2.5.2.3), um eine unterschiedliche klonale Verteilung der T-Zellen ausschließen zu können (Abb. 16A und B). Mit Ausnahme der erwünschten unterschiedlichen CD62L-Expression zeigten die CD8⁺ T-Zellen der beiden Mausstämme jedoch sowohl im naiven als auch im antigenstimulierten Zustand keine relevanten Unterschiede, sowohl bezüglich der Expression ihrer Oberflächenmarker als auch bezüglich des TCR V β Musters.

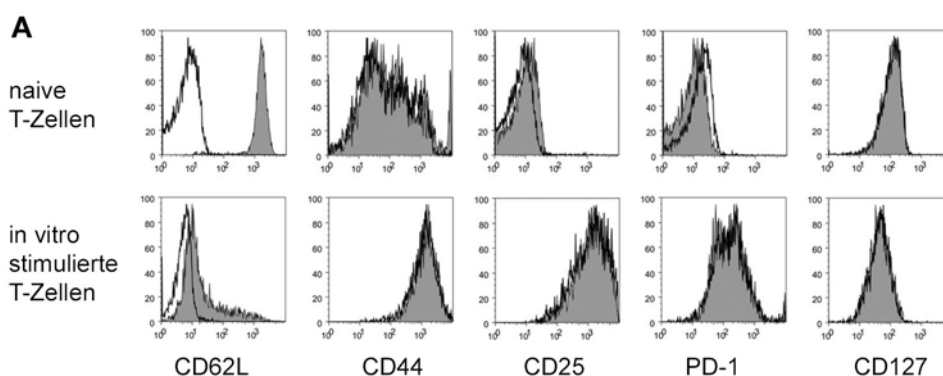
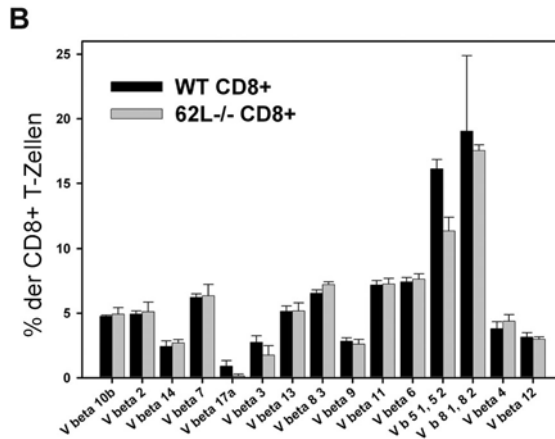


Abbildung 16: CD8⁺ T-Zellen von WT oder CD62L^{-/-} Mäusen zeigen - mit Ausnahme von CD62L – eine vergleichbare Oberflächenmarkerexpression, sowie ein sehr ähnliches TCR V β Repertoire.

A) Naive CD8⁺ polyklonale T-Zellen von WT (grau schattierte Histogramme) oder CD62L^{-/-} Mäusen (offene Histogramme) wurden aus Milzen aufgereinigt und im FACS für die Oberflächenmarker CD62L, CD44, CD25, CD127 und PD-1 analysiert (obere Reihe). Zudem wurden CD8⁺ T-Zellen von beiden Mausstämmen fünf Tage lang *in vitro* mit anti-CD3/CD28-beads stimuliert und im FACS für die genannten Oberflächenmarker gefärbt (untere Reihe).

B) Aufgereinigte, naive CD8⁺ polyklonale T-Zellen von jeweils fünf WT (schwarz) und fünf CD62L^{-/-} Mäusen (grau) wurden für verschiedene V β TCR-Ketten mit den FITC-konjugierten Antikörpern des Mouse V β TCR Screening Panels (BD Pharmingen) gefärbt und im FACS analysiert. Die Prozentsätze wurden in Abhängigkeit der Gesamtzahl an CD8⁺ T-Zellen dargestellt.



4.1.1.2 Abwesenheit der CD62L-Expression führt zu verminderter bzw. verzögerter aHP

Durch den Transfer aufgereinigter, naiver WT bzw. CD62L^{-/-} CD8⁺ T-Zellen in RAG2^{-/-} Mäuse sollte abgeklärt werden, inwieweit sich das Fehlen der CD62L-Expression bei den CD62L^{-/-} CD8⁺ T-Zellen auf die LIP dieser polyklonalen Zellen auswirkt. Hierzu wurden CFSE-markierte WT bzw. CD62L^{-/-} Zellen an verschiedenen Zeitpunkten nach Transfer in RAG2^{-/-} Mäuse mittels FACS bezüglich ihres CFSE-Gehalts untersucht. WT T-Zellen aus den Milzen und Lymphknoten dieser Tiere hatten sich an Tag vier bereits ca. dreimal geteilt, wohingegen die CD62L^{-/-} T-Zellen noch immer ihren ursprünglichen CFSE-Gehalt besaßen. Erst an Tag acht zeigten auch die CD62L^{-/-} T-Zellen proliferative Aktivität. Ferner waren an Tag vier bereits vereinzelt CFSE-negative WT BLP T-Zellen zu sehen, bei den CD62L^{-/-} T-Zellen dagegen erst an Tag acht (Abb. 17A). Ob es sich bei den CFSE-negativen WT T-Zellen an Tag acht ausschließlich um BLP T-Zellen handelte, oder aber um aHP T-Zellen, welche sich bereits mindestens siebenmal geteilt hatten, und somit ihr CFSE komplett ausverdünn hatten, ist mit diesem Experiment unter Verwendung polyklonaler Populationen nicht eindeutig zu beurteilen.

Um die aHP getrennt von der BLP betrachten zu können, und um somit ausschließen zu können, dass einzelne T-Zellklone der polyklonalen CD8⁺ T-Zellen durch unterschiedlich affine TCR auf Fremdanigene reagieren konnten, wurden 2C TCRtg RAG2^{-/-} Mäuse mit CD62L^{-/-} Mäusen gekreuzt.

Auch bei der Charakterisierung dieser nun monoklonalen T-Zellpopulation konnten wir ein verspätetes Abfließen der aHP bei 2C TCRtg CD62L^{-/-} T-Zellen (2C CD62L^{-/-} T-Zellen) im Vergleich zu 2C T-Zellen mit einer intakten CD62L-Expression beobachten (Abb. 17B).

Das Fehlen von CD62L schwächt also sowohl die LIP polyklonaler T-Zellen als auch die aHP von 2C TCRtg T-Zellen ab, allerdings werden weder LIP noch aHP durch diesen CD62L-Defekt komplett unterdrückt, sondern sie beginnen nur verzögert.

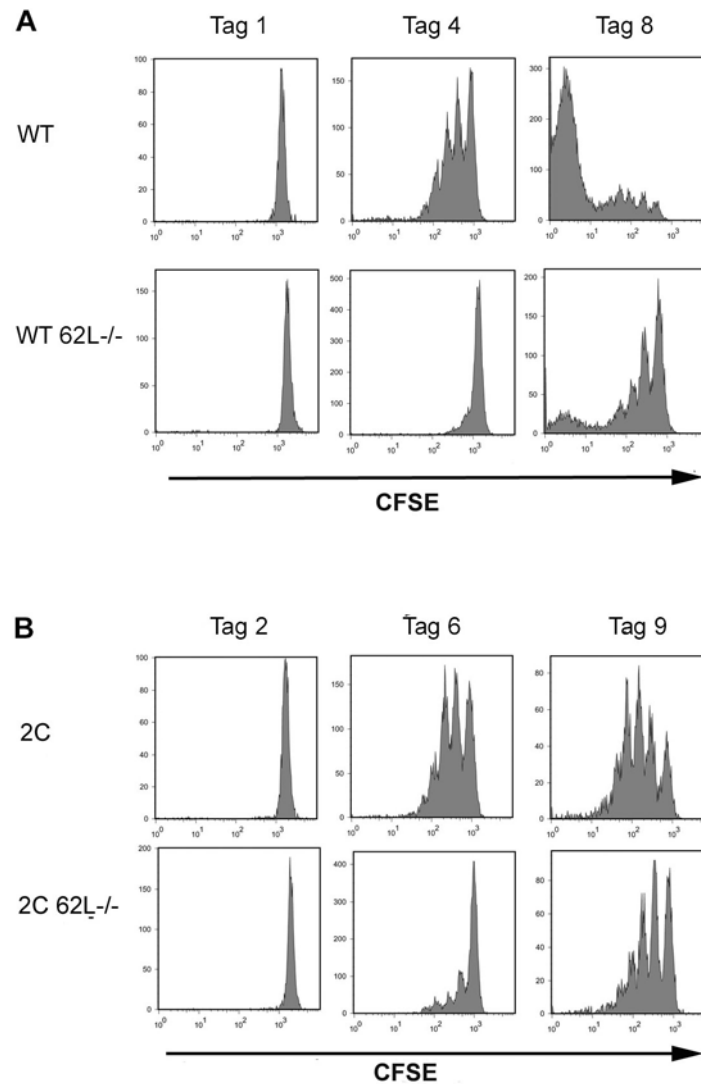


Abbildung 17: Polyklonale bzw. 2C CD62L^{-/-} T-Zellen zeigen im lymphopenen Empfänger eine geringere proliferative Kapazität als WT bzw. 2C T-Zellen

A) Pro RAG2^{-/-} Maus wurden 8×10^6 CFSE-markierte WT bzw. CD62L^{-/-} T-Zellen retrobulbär gespritzt. Zu den angegebenen Zeitpunkten erfolgte die Entnahme von Milz und mLN, welche zur Einzelzellsuspension verarbeitet wurden. Die Proben wurden für die FACS-Analyse mit anti-CD8-APC, anti-CD3-PE und PI gefärbt. Das Gate wurde auf die PI-negativen (lebenden), CD3- und CD8-doppelt positiven T-Zellen gesetzt.

Die Histogramme zeigen die CFSE-Verteilung zu verschiedenen Zeitpunkten der LIP.

B) Ebenso wurde mit je 5×10^6 CFSE-markierten 2C bzw. 2C CD62L^{-/-} T-Zellen verfahren. Gefärbt wurde mit anti-1B2-APC und PI, wobei das Gate auf die lebenden, PI-negativen, 1B2-APC-positiven T-Zellen gesetzt wurde.

4.1.2 aHP findet in sekundären Lymphorganen statt

4.1.2.1 LIP in der LT $\alpha\beta$ ^{-/-} Maus: aHP benötigt intakte Lymphorgane

Als nächstes stellte sich die Frage, ob die verminderte LIP der $CD62L^{-/-}$ T-Zellen auf eine verminderte Homing-Fähigkeit dieser T-Zellen zurückzuführen ist, oder ob diese knockout T-Zellen Defekte in der Proliferation besitzen.

Um die Relevanz des Homingprozesses in die Lymphorgane zu unterstreichen, untersuchten wir die aHP in $LT\alpha\beta^{-/-}$ Mäusen, welche weder Lymphknoten noch Peyer-Plaques besitzen, und zudem eine defekte Milzstruktur aufweisen (Alimzhanov et al., 1997; Banks et al., 1995). Da diese Tiere keinen RAG-Background besitzen, mussten sie vor Experimentbeginn durch Bestrahlung akut-lymphopen gemacht werden.

Wurden naive, polyklonale $CD8^{+}$ T-Zellen in eine bestrahlte C57BL/6 Wildtypmaus transferiert, so führte dies auch in diesem Modell zur LIP der transferierten Zellen, und es fand sowohl aHP als auch BLP statt (Abb. 18). Wurden diese T-Zellen jedoch in eine bestrahlte $LT\alpha\beta^{-/-}$ Maus injiziert, so waren sowohl aHP als auch BLP stark verringert. Beide proliferativen Immunantworten sind also von intakten Strukturen der sekundären Lymphorgane abhängig.

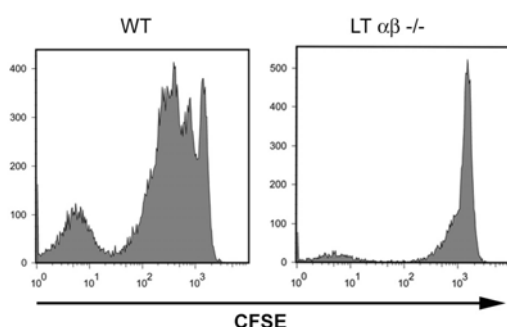


Abbildung 18: aHP und BLP findet in bestrahlten C57BL/6 Mäusen statt, jedoch nicht in bestrahlten $LT\alpha\beta^{-/-}$ Mäusen

8×10^6 mit CFSE gefärbte $CD8^{+}$ polyklonale T-Zellen wurden sowohl in eine C57BL/6 als auch in eine $LT\alpha\beta^{-/-}$ Maus transferiert, welche beide zuvor mit 2×600 cGy akut-lymphopen gemacht wurden. An Tag fünf nach T-Zelltransfer wurden die Milzen isoliert, zu Einzelzellsuspensionen verarbeitet, und nach einem ACK-Lyseschritt für die FACS-Analyse mit anti- $CD8$ -APC gefärbt. Das Gate wurde auf die PI-negativen (lebenden), $CD8$ -APC-positiven T-Zellen gesetzt. Dargestellt sind Histogramme für die CFSE-Verteilung der T-Zellen.

4.1.2.2 Lymphknoten sind die bevorzugten Kompartimente für aHP T-Zellen

4.1.2.2.1 Wildtyp T-Zellen akkumulieren während der aHP im Lymphknoten

Da $CD62L$ nur beim Homing in die Lymphknoten eine Rolle spielt, nicht jedoch beim Einwandern in die Milz, vermuteten wir, dass der Lymphknoten das Kompartiment innerhalb der sekundären Lymphorgane (SLO) für die aHP ist. Um dies abzuklären wurde die LIP von naiven, $CD8^{+}$ polyklonalen T-Zellen in $RAG2^{-/-}$ Mäuse nach einem, vier bzw.

acht Tagen gestoppt, um aus Milz, Lymphknoten, Knochenmark, Thymus und Blut die Anzahl der eingewanderten T-Zellen bestimmen zu können (Abb. 19A). Ein entsprechender Versuch wurde auch mit transgenen 2C T-Zellen durchgeführt und an den Tagen drei, sechs und neun analysiert (Abb. 19B). Sowohl polyklonale $CD8^+$ T-Zellen als auch 2C TCRtg T-Zellen sammelten sich überwiegend in den Lymphknoten an. Fast 60 Prozent der lebenden Zellen des $RAG2^{-/-}$ Lymphknotens bestanden an Tag acht aus $CD8^+$ polyklonalen T-Zellen, und auch die 2C TCRtg T-Zellen stellten ab Tag sechs knapp 50 Prozent aller lebenden Zellen des Lymphknotens dar. Neben den Lymphknoten enthielt nur noch die Milz mit ca. drei bis sechs Prozent detektierbare Mengen an transferierten T-Zellen. Allerdings blieb die Anzahl dieser T-Zellen in der Milz über die Zeit hinweg nahezu konstant. Knochenmark und Thymus spielten keine Rolle für die LIP bzw. aHP, und auch im Blut konnten nur zeitweise größere Mengen an zirkulierenden T-Zellen beobachtet werden.

Da die FACS Färbungen nur die relative Veränderung der T-Zellzahl zur Zellzahl im Organ misst, wurden zur Bestätigung dieser Beobachtungen zusätzlich für polyklonale $CD8^+$ T-Zellen immunhistochemische Untersuchungen von Milz und mLN durchgeführt. Auch hier war über die Zeit eine deutliche Zunahme von anti-CD3 gefärbten T-Zellen im Lymphknoten zu verzeichnen. In den Paraffinschnitten der Milzen dagegen konnten zwar in den T-Zellzonen auch eingewanderte T-Zellen detektiert werden, allerdings nahm die Menge der anti-CD3 gefärbten T-Zellen über den Zeitverlauf hinweg kaum zu (Abb. 19C).

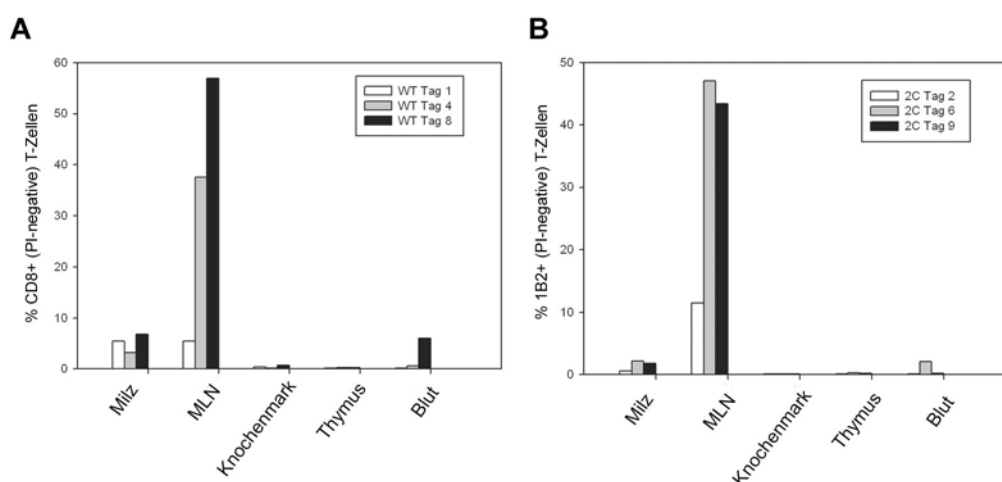


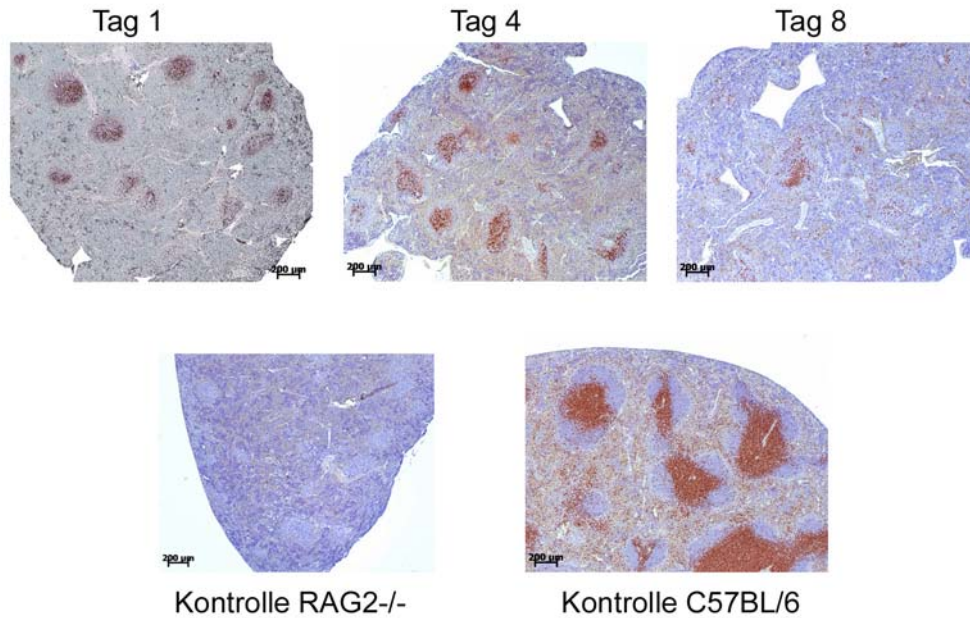
Abbildung 19: Prozentsatz von LIP $CD8^+$ polyklonalen T-Zellen bzw. von aHP 2C TCRtg T-Zellen nimmt über die Zeit in den mLN zu und bleibt in der Milz konstant

A) $RAG2^{-/-}$ Mäusen wurden jeweils 8×10^6 CFSE-markierte, $CD8^+$ polyklonale T-Zellen injiziert. Die nach einem, vier bzw. acht Tagen LIP entnommenen Organe (Milz, mLN, Knochenmark und Thymus) wurden zu Einzelzellsuspensionen

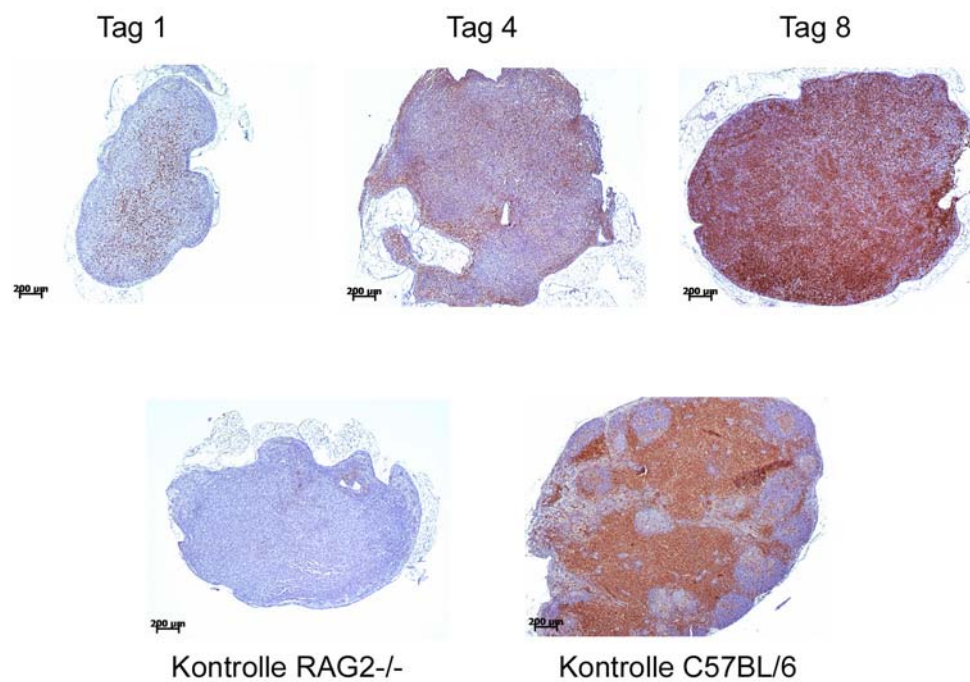
verarbeitet, und nach einem ACK-Lyseschritt für die FACS-Analyse mit anti-CD3-PE und anti-CD8-APC gefärbt. Das Gate wurde auf die PI-negativen, CD8-APC und CD3-PE doppelt-positiven T-Zellen gesetzt, so dass der Prozentsatz an eingewanderten $CD8^+$ T-Zellen bestimmt werden konnte. Zudem wurde der Prozentsatz der doppelt-positiven T-Zellen im Blut bestimmt.

B) Ebenso wurden $RAG2^{-/-}$ Mäusen jeweils 8×10^6 mit CFSE gefärbte 2C TCRtg T-Zellen injiziert. Der Versuch wurde nach zwei, sechs bzw. neun Tagen beendet und die Suspensionen der einzelnen Organe bzw. das Blut wurden mit anti-1B2-APC gefärbt. Gegatet wurde auf PI-negativ, 1B2-APC positive T-Zellen.

Milz



Lymphknoten



C) Von den RAG2^{-/-} Mäusen aus Versuch A wurden von jeder Milz bzw. jedem mLN ein intaktes Organstück in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Die 4 µm dicken Paraffinschnitte wurden anschließend mit anti-CD3 gefärbt (braun) und mit Hämatoxylin gegengefärbt (blau). Dargestellt sind Milzschnitte (oben) nach einem, vier bzw. acht Tagen LIP in RAG2^{-/-} Mäusen. Als Kontrollen dienten unbehandelte RAG2^{-/-} sowie C57BL/6 Mäuse. Ebenso wurde mit den Lymphknotenschnitten verfahren (unten).

4.1.2.2.2 T-Zellen mit einem Defekt in der CD62L-Expression können nicht im gleichen Maß in Lymphknoten einwandern wie WT T-Zellen

Entsprechende Versuche wurden auch mit WT CD62L^{-/-} bzw. der 2C 62L^{-/-} T-Zellen durchgeführt. Die FACS-Detektion der transferierten CD62L^{-/-} bzw. der 2C 62L^{-/-} T-Zellen in Milz, mLN und Knochenmark untermauerte unsere Hypothese, dass der Lymphknoten das Kompartiment ist, in welchem die aHP stattfindet. Nach Transfer von WT und CD62L^{-/-} bzw. von 2C und 2C CD62L^{-/-} T-Zellen in RAG2^{-/-} Mäuse fanden wir, dass sowohl Wildtyp T-Zellen als auch T-Zellen mit einem CD62L-Defekt in gleichem Maß in die Milzen gelangen konnten, wohingegen sowohl polyklonale als auch TCR transgene CD62L^{-/-} CD8⁺ T-Zellen kaum in die Lymphknoten einwandern konnten. Das Knochenmark spielte für die LIP von naiven T-Zellen keine Rolle, und auch Zellen mit einem CD62L-Defekt wanderten nicht verstärkt dorthin (Abb. 20 A und B).

Bestätigen konnten wir diese Beobachtungen wieder mittels Immunhistoschnitten, welche das unterschiedlich starke Einwandern von WT CD8⁺ T-Zellen im Vergleich zu CD62L^{-/-} T-Zellen in die Lymphknoten veranschaulichten. Dazu wurden die in die Lymphknoten eingewanderten T-Zellen mit anti-CD3 angefärbt. Die Lymphknotenschnitte von Tag acht zeigten wesentlich mehr eingewanderte WT T-Zellen, als die mLN aus Mäusen, welchen CD62L^{-/-} CD8⁺ T-Zellen gespritzt wurden. Zu den frühen Zeitpunkten sind in den Schnitten zudem kaum CD62L^{-/-} wohl aber WT CD8⁺ T-Zellen zu sehen (Abb. 20C).

Das Homing von naiven T-Zellen in Lymphknoten scheint also für die LIP bzw. die aHP von großer Wichtigkeit zu sein. Die LIP von WT CD62L^{-/-} bzw. die aHP von 2C 62L^{-/-} T-Zellen kann erst anlaufen, wenn die Zellen den Weg in den Lymphknoten über einen CD62L-unabhängigen Mechanismus gefunden haben. Vermutlich ergibt sich daraus das verspätete Starten der proliferativen Immunantworten unter lymphopenen Bedingungen.

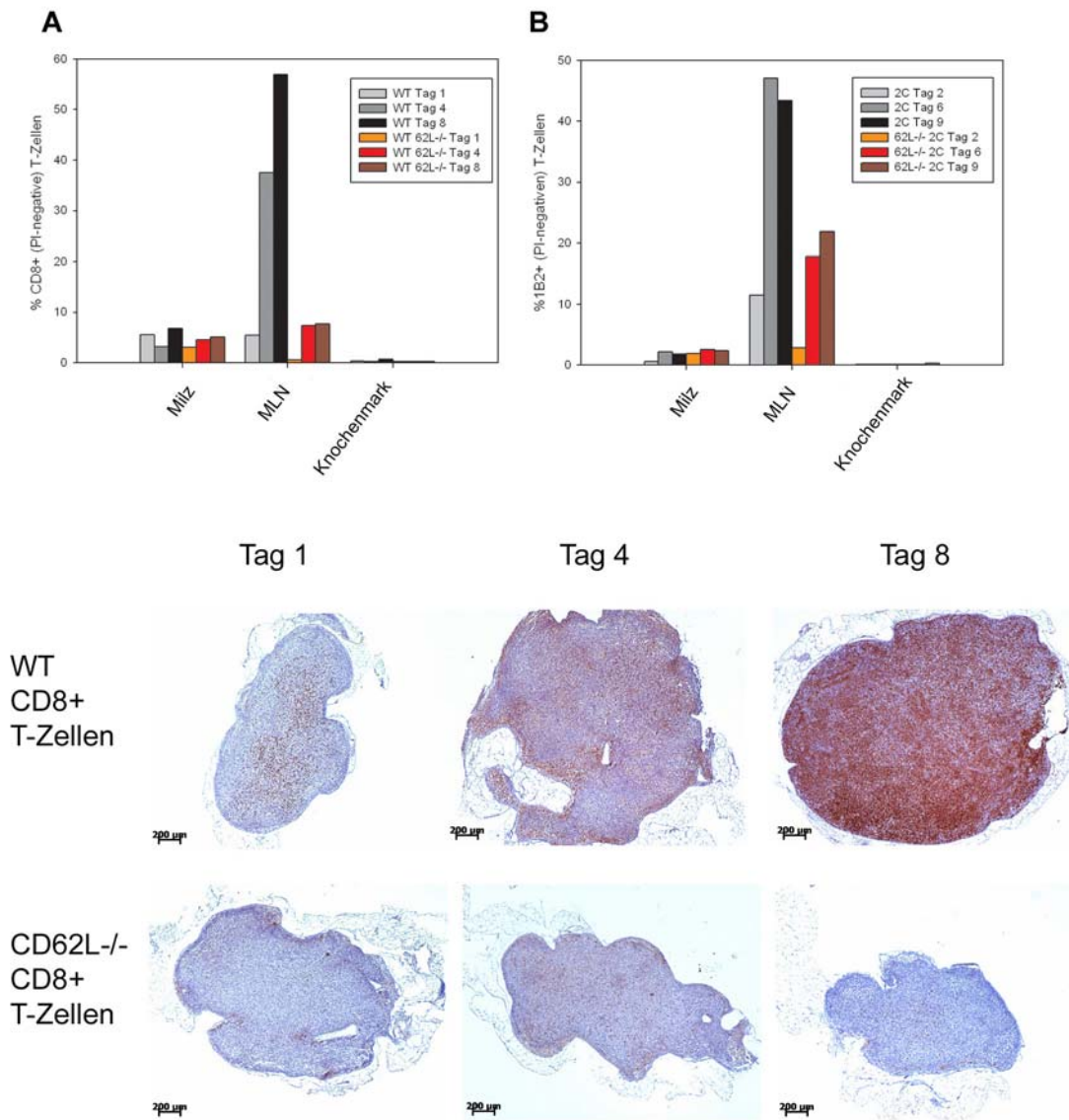


Abbildung 20: Defekt in der CD62L-Expression verringert den Prozentsatz der T-Zellen, die in die Lymphknoten einwandern können

Um WT T-Zellen mit CD62L^{-/-} T-Zellen vergleichen zu können, wurden entsprechend Experiment 19 auch WT CD62L^{-/-} T-Zellen bzw. 2C CD62L^{-/-} T-Zellen mit CFSE markiert und in RAG2^{-/-} Mäuse transferriert.

A, B) Dargestellt sind die Prozentsätze von PI-negativen, anti-CD3 und anti-CD8 doppelt-positiven T-Zellen (A) bzw. PI-positiven, 1B2-positiven (B) T-Zellen, welche aus Milz, mLN oder Knochenmark isoliert wurden (vgl. auch Abbildung 19 A und B).

C) Zudem wurde von jeder RAG2^{-/-} Maus, welcher WT CD8⁺ polyklonale T-Zellen bzw. CD62L^{-/-} CD8⁺ polyklonale T-Zellen injiziert wurden, ein Lymphknoten in Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet, geschnitten und mit anti-CD3 gefärbt (braun) bzw. mit Hämatoxylin gegengefärbt (blau).

Im Gegensatz zu WT T-Zellen (obere Reihe) sind CD62L^{-/-} T-Zellen (untere Reihe) auch acht Tage nach Transfer in ein lymphopenes Empfängertier kaum in den Lymphknoten zu detektieren. Für Kontrollen siehe Lymphknotenschnitte Abbildung 19C (Kontrolle RAG2^{-/-} und Kontrolle C57BL/6 Maus).

4.1.3 T-Zellen mit CD62L-Defekt können Tumorzellen zwar *in vitro* attackieren, jedoch *in vivo* nicht kontrollieren

Wie unter 3.2 beschrieben, konnten naive 2C TCRtg T-Zellen unter lymphopenen Bedingungen homöostatisch proliferieren und das Auswachsen eines Tumors verhindern. Im Folgenden sollte geklärt werden, ob 2C CD62L^{-/-} T-Zellen das Tumorstadium in einer lymphopenen Maus ähnlich gut wie 2C TRCtg T-Zellen kontrollieren, obwohl diese T-Zellen aufgrund ihres Defekts nicht in Lymphknoten einwandern können und nur verminderte aHP zeigten. Vergleichende Experimente zum Tumorangriff unter *in vitro* und *in vivo* Bedingungen sollten zudem einen funktionellen Defekt der 2C CD62L^{-/-} T-Zellen beim Tumorangriff ausschließen und nochmals die wichtige Rolle des Homingprozesses in die Lymphknoten via CD62L für die aHP bzw. für die Tumorkontrolle verdeutlichen.

4.1.3.1 2C CD62L^{-/-} und 2C T-Zellen besitzen *in vitro* vergleichbare lytische und proliferative Aktivitäten

Um eine mögliche intrinsisch verminderte anti-Tumoraktivität der 2C CD62L^{-/-} T-Zellen ausschließen zu können, wurden sowohl ein Killassay als auch ein Proliferationsassay durchgeführt. Der ⁵¹Cr-Release Killassay mit *in vitro* stimulierten 2C und 2C 62L^{-/-} T-Zellen zeigte, dass beide T-Zellpopulationen einen spezifischen Tumor (P815) erkennen und angreifen, wohingegen sie einen unspezifischen Tumor (EL4) nicht attackieren. Weder 2C noch 2C 62L^{-/-} T-Zellen konnten zudem, wie erwartet, als naive T-Zellen einen spezifischen Tumor in vergleichbarer Weise lysieren wie bereits aktivierte T-Zellen (Abb. 21A).

Ein Proliferationsassay mit anti-CD3/anti-CD28 Stimulation zeigte, dass naive 2C 62L^{-/-} T-Zellen *in vitro* sogar etwas besser proliferieren konnten als 2C T-Zellen (Abb. 21B).

Unsere Daten weisen somit darauf hin, dass der Gendefekt für CD62L^{-/-} keinen Einfluss auf die immunologischen *in vitro* Funktionen dieser T-Zellen hat. Bis auf die fehlende CD62L-Oberflächenexpression und der damit verbundenen Unfähigkeit, in Lymphknoten einzuwandern, konnten wir für CD62L^{-/-} T-Zellen bislang keinen weiteren funktionellen Defekt detektieren. Unterschiede unter *in vivo* Bedingungen sind somit vermutlich auf einen Homing-Defekt zurückzuführen.

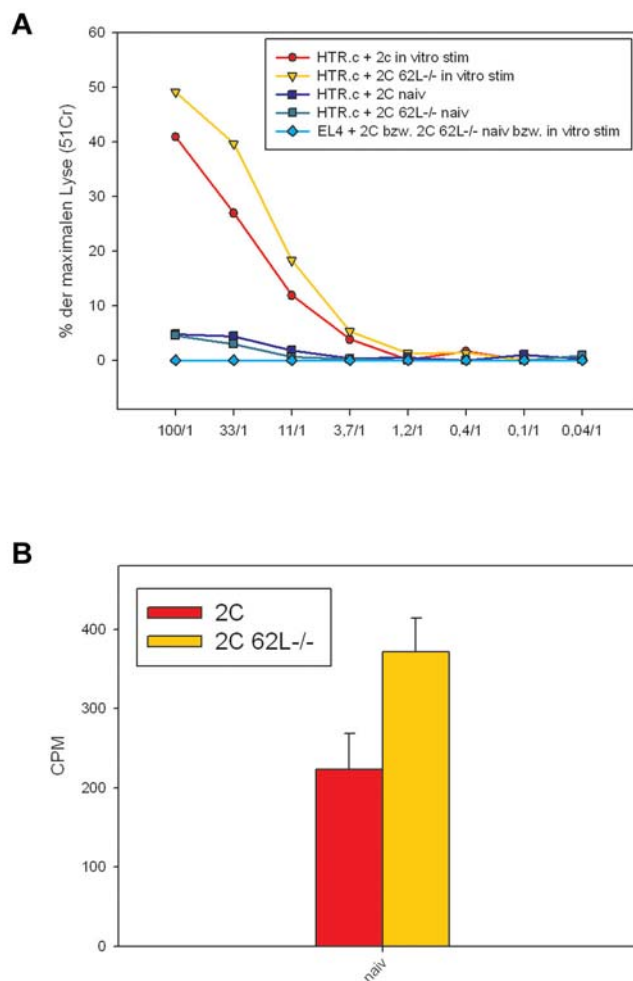


Abbildung 21: In vitro zeigen 2C und 2C CD62L^{-/-} T-Zellen vergleichbare lytische und proliferative Eigenschaften

A) Naive bzw. *in vitro* stimulierte 2C bzw. 2C 62L^{-/-} T Zellen wurden mit ⁵¹Cr-markierten HTR.c- oder EL4-Tumorzellen (Negativkontrolle) für vier Stunden co-kultiviert.

Der Prozentsatz der spezifischen Lyse wurde wie folgt bestimmt:

$$\frac{((\text{lysis} - \text{lysis min}) / (\text{lysis max} - \text{lysis min})) \times 100.}$$

B) Je 100.000 2C oder 2C CD62L^{-/-} naive T-Zellen wurden pro well (beschichtet mit anti-CD3 und anti-CD28) eingesetzt. Nach einer Inkubation von 48 Stunden erfolgte die Zugabe von ³H-Thymidin. Nach weiteren sechs Stunden wurde der ³H-Einbau der beiden T-Zellgruppen gemessen.

4.1.3.2 Im Gegensatz zur *in vivo* Kontrolle des Tumorstwachstums hat die Abwesenheit von CD62L^{-/-} keinen Einfluss auf die direkte T-Zell-TAA-Interaktion unter *in vitro* Bedingungen

Im 2C Tumormodell (Abschnitt 3.2, Abb. 15) konnten wir zeigen, dass die aHP die Tumorkontrolle unter *in vivo* Bedingungen unterstützt. Schließlich sollte in einem *in vivo* Experiment geklärt werden, ob der CD62L-Defekt nicht nur das Einwandern in die Lymphknoten und somit die HP von T-Zellen abschwächt, sondern ob 2C CD62L^{-/-} T-Zellen auch im Hinblick auf die Fähigkeit, *in vivo* einen Tumor abzustößen, beeinträchtigt sind.

Für diese Fragestellung wurde anstelle des allogenen Tumors P815 (HTR.c) das syngene Fibrosarkom MC57 benutzt. Diese Tumorzellen wurden mit dem induzierbaren Peptid SIYRYYYGL (=SIY) transfiziert, welches der 2C TCR im Kontext mit MHC Klasse I K^b

überwiegend über eine indirekte Präsentation via DC im Lymphknoten erkennt (Spiotto et al., 2002). Um diesen Tumor kontrollieren zu können, müssten T-Zellen in die Lymphknoten einwandern können, zum einen, um dort das SIY-Peptid präsentiert zu bekommen, und zum anderen, um homöostatisch zu proliferieren.

1×10^6 MC57-SIY ind. Tumorzellen wurden RAG2^{-/-} Mäusen subkutan in die Flanke gespritzt. Nach zehn Tagen betrug der Durchmesser der meisten Tumoren ca. 5 x 5 mm, und den Mäusen wurden 2C T-Zellen bzw. 2C CD62L^{-/-} T-Zellen injiziert. Die folgenden fünf Tage wuchsen die Tumoren noch weiter, dann aber konnten die 2C T-Zellen das Wachstum etwa eine Woche lang kontrollieren, bevor der Tumor schließlich endgültig auswuchs. Im Gegensatz zu den 2C T-Zellen konnten die 2C CD62L^{-/-} T-Zellen das Wachstum dieser etablierten Tumoren zu keinem Zeitpunkt kontrollieren (Abb. 22A). Neben einer nur sehr langsam anlaufenden aHP zeigten 2C CD62L^{-/-} T-Zellen also auch einen Defekt in der Tumorkontrolle, wohingegen 2C T-Zellen sogar in der Lage waren, etablierte Tumoren zeitweise zu kontrollieren.

Dass sowohl 2C als auch 2C CD62L^{-/-} T-Zellen die MC57-SIY ind. Tumorzellen angreifen können, zeigten die vergleichbaren Zytokinmengen, welche aus Überständen der Co-Kulturen dieser beiden T-Zellpopulationen mit MC57-SIY ind. mittels ELISA detektiert werden konnten. Für diesen Versuch wurden verschieden vorbehandelte Tumorzellen eingesetzt: Mit MitomycinC vorbehandelten Tumorzellen kann nur die Interaktion von TCR und TAA getestet werden, wohingegen nicht vorbehandelte Tumorzellen z.B. im Zuge eines Gegenangriffs inhibitorische Moleküle an die Angriffsstelle bewegen können. Werden Tumorzellen bestrahlt, so wird wiederum nur die Interaktion von TCR und TAA getestet, wobei in diesem Fall mögliche Effekte von Mitomycinresten auf die T-Zellfunktion ausgeschlossen werden können. Die beiden T-Zellpopulationen lieferten jedoch stets vergleichbare IFN- γ Mengen, unabhängig davon, ob sie mit unbehandelten, bestrahlten oder mit MitomycinC vorbehandelten Tumorzellen co-kultiviert wurden (Abb. 22B).

Wie auch beim Killassay konnten sowohl 2C als auch 2C CD62L^{-/-} T-Zellen die Tumorzellen *in vitro* gleich gut attackieren. Ein intrinsischer funktioneller Defekt, welcher den CD62L-defizienten 2C-Zellen den Angriff auf Tumorzellen erschweren könnte, liegt also nicht vor. Die Ergebnisse dieser *in vitro* und *in vivo* Versuche sprechen dafür, dass T-Zellen nach adoptivem Transfer in die Lymphknoten einwandern und homöostatisch proliferieren müssen, um einen Tumor kontrollieren zu können.

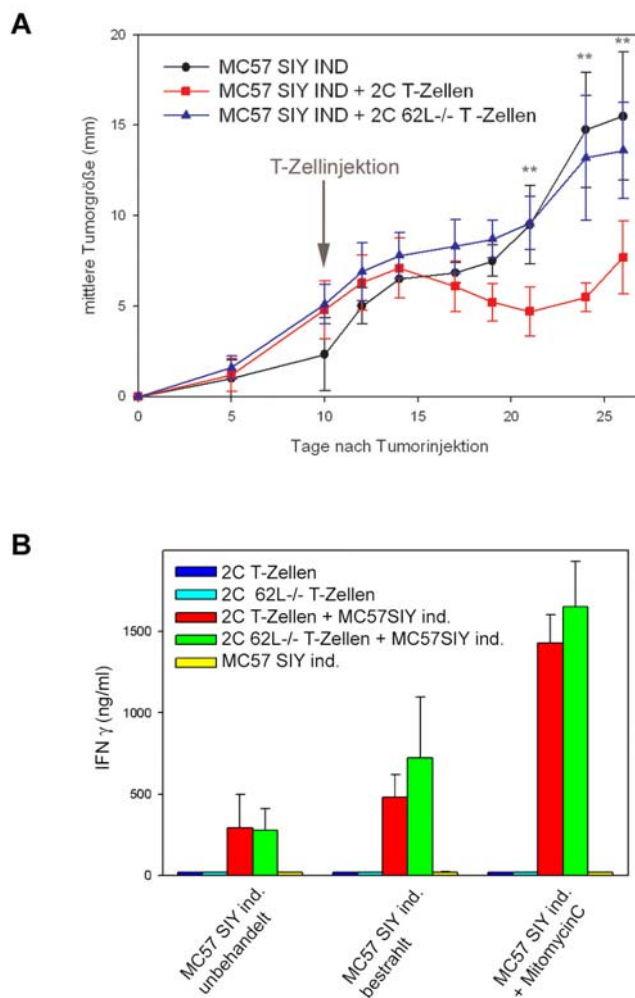


Abbildung 22: Das Fehlen von CD62L macht die Kontrolle des Tumorwachstums von MC57-SIY ind. unmöglich

A) An Tag 0 wurden Gruppen von jeweils drei bis fünf RAG2^{-/-} Mäusen s.c. jeweils 1×10^6 MC57-SIY ind. Tumor-zellen in 100 μ l PBS in die Flanke gespritzt. Zehn Tage später wurden 1×10^6 naive 2C oder CD62L^{-/-} 2C TCRtg RAG2^{-/-} T-Zellen i.v. injiziert. Die Durchmesser der einzelnen Tumoren wurden zu den angegebenen Zeitpunkten bestimmt. Die mit ** gekennzeichneten Werte sind als statistisch signifikant zu betrachten.

Dieses Tumorexperiment ist eines von drei unabhängig durchgeführten Experimenten.

B) Aufgereinigte naive 2C bzw. CD62L^{-/-} 2C T-Zellen wurden mit P815.B7.1 repetitive stimuliert und anschließend mit unbehandelten, bestrahlten oder mit MitomycinC vorbehandelten MC57-SIY ind. Tumorzellen im Verhältnis 1:1 co-kultiviert. Nach 18 Stunden wurde aus den Überständen der jeweilige IFN γ Gehalt mittels ELISA bestimmt.

4.2 PD-1-Überexpression wirkt inhibitorisch auf die aHP 2C TCRtg T-Zellen

Wie in der Einleitung beschrieben, ist PD-1 ein Molekül, welches sowohl bei der Induktion als auch für die Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz eine wichtige Rolle spielt (Okazaki and Honjo, 2006). Sowohl die polyklonalen CD4⁺ T-Zellen im Autoimmunmodell der Colitisinduktion als auch die transgenen 2C T-Zellen im 2C-Tumormodell brechen die periphere Toleranz im Rahmen einer Lymphopenie-induzierten Proliferation. In Bezug auf das Autoimmunmodell könnte also eine Verstärkung des PD-1/PDL Signalwegs besseren Schutz vor einer starken Autoimmunreaktion vermitteln. Umgekehrt ist die inhibitorische Wirkung von PD-1/PDL bei einer Immunantwort auf TAA unerwünscht. Bei einer Tumorthherapie würde man deshalb versuchen, alle Einflüsse

zu eliminieren, die einem erfolgreichen Angriff der T-Zellen auf Tumorzellen entgegenwirken.

4.2.1 Regulation der PD-1-Expression von 2C TCRtg T-Zellen

Wie ich für den aHP Phänotyp unter Punkt 2 zeigen konnte, sind aHP T-Zellen zu über 90 Prozent negativ für PD-1. In einer detaillierteren Analyse der PD-1-Oberflächenexpression von CFSE-markierten 2C T-Zellen aus Milz und mLN nach drei, sechs, neun, 24, 34 oder 65 Tagen aHP, konnte jedoch wiederholt ein kleiner Prozentsatz von ca. drei Prozent PD-1-positiven 2C aHP T-Zellen beobachtet werden. Dabei handelte es sich immer um die Zellpopulation mit der stärksten CFSE-Ausverdünnung, d.h. um die T-Zellen, die am schnellsten proliferieren (Abb. 23). Diese Beobachtung ließ uns vermuten, dass eine überschießende HP durch PD-1 negativ reguliert werden kann.

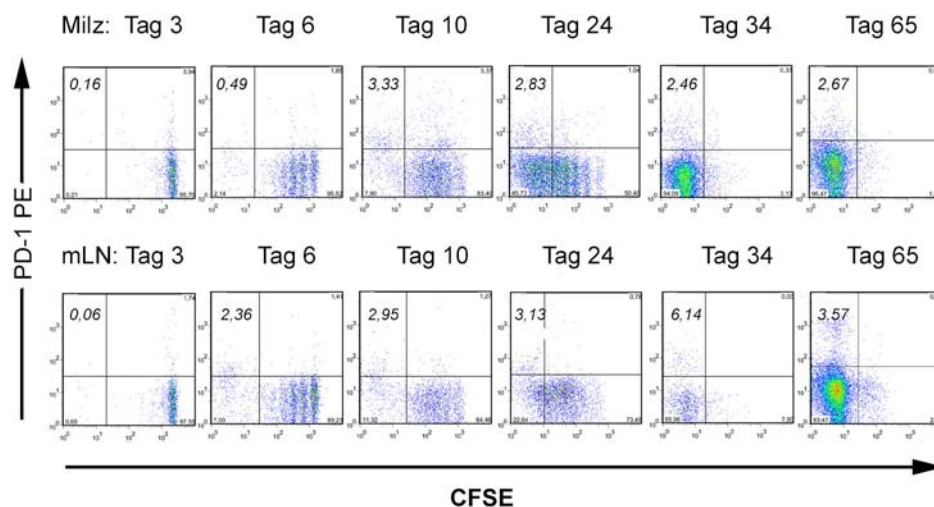


Abbildung 23: Detektion der PD-1 positiven 2C T-Zellen nach unterschiedlich langer aHP

RAG2^{-/-} Mäusen wurden jeweils 5×10^6 mit CFSE gefärbte 2C T-Zellen injiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten erfolgte die Entnahme von Milz und mLN. Zur Vorbereitung der FACS-Analysen wurden die Einzelzellsuspensionen mit anti-1B2-APC, anti-PD-1-PE und PI gefärbt. Das Gate wurde auf die PI- negativen (lebenden), 1B2-APC positiven T-Zellen gelegt. Die Dotplotdarstellungen zeigen die PD-1-Expression der 2C T-Zellen im Verlauf der aHP in Abhängigkeit des jeweiligen CFSE-Gehalts.

4.2.2 2C und 2C PD1^{-/-} T-Zellen zeigen in vivo eine stärkere aHP als 2C PD1tg T-Zellen

Ich stellte daher die Hypothese auf, dass PD-1 eine begrenzende Funktion bei der aHP inne hat. Eine PD-1-Überexpression könnte die aHP von T-Zellen verstärkt begrenzen, und somit auch Einfluss auf die langsam proliferierenden T-Zellen nehmen. Um dies zu untersuchen wurden 2C TCRtg RAG2^{-/-} Tiere mit PD1tg Tieren (Keir et al., 2005) gekreuzt. Anschließend verglichen wir die proliferative Kapazität der 2C TCRtg T-Zellen mit 2C PD1tg und 2C PD1^{-/-} T-Zellen. Dazu wurden aufgereinigte naive T-Zellen mit CFSE markiert und in RAG2^{-/-} Mäuse transferiert. Zu drei verschiedenen Zeitpunkten wurden die aHP T-Zellen wieder aus Milz und mLN isoliert und getrennt im FACS analysiert.

Beim Vergleich der CFSE-Profile der isolierten aHP 2C, 2C PD1^{-/-} und 2C PD1tg T-Zellen fiel auf, dass nur die 2C PD1^{-/-} T-Zellen bereits an Tag drei zu proliferieren begannen. Große Unterschiede in den proliferativen Kapazitäten der drei T-Zellpopulationen waren für die weiteren Tage jedoch nicht zu beobachten (Abb. 24A).

Allerdings konnten zu allen untersuchten Zeitpunkten stets am wenigsten aHP 2C PD1tg T-Zellen aus Milz und mLN isoliert werden (Abb. 24B). Obwohl also die drei Zellpopulationen vergleichbare proliferative Kapazität bezüglich des gesamten Pools aller proliferierenden Zellen besitzen, so konnten doch weniger aHP 2C PD1tg T-Zellen isoliert werden. Dies führte zu der Hypothese, dass innerhalb der 2C PD1tg T-Zellpopulation weniger Klone eine schnelle Proliferation zeigen.

Ein Vergleich der Prozentsätze der CFSE-negativen 2C, 2C PD1^{-/-} bzw. 2C PD1tg aHP T-Zellen bestätigte diese Vermutung. An Tag drei waren kaum CFSE-negative Zellen vorhanden, weder bei 2C- noch bei 2C PD1tg- oder 2C PD1^{-/-} T-Zellen. An Tag sechs und Tag neun waren bei 2C PD1^{-/-} T-Zellen aus der Milz (mit 4% und 24%) die meisten CFSE-negativen Zellen zu finden, gefolgt von 2C T-Zellen (mit 1,6% und 11%), wohingegen diese bei 2C PD1tg T-Zellen nur in relativ geringen Mengen vorhanden waren (mit 0,7% und 4,8%) (Abb. 24C).

Die geringere Zellzahl an isolierten 2C PD1tg T-Zellen könnte jedoch auch am verstärkten Absterben dieser transgenen Zellen liegen. Diese Hypothese wurde mit Hilfe einer Doppelfärbung von AnnexinV und Propidiumjodid untersucht. Dazu wurden an Tag drei, Tag sechs und Tag neun die aHP 2C-, 2C PD1tg- und 2C PD1^{-/-} T-Zellen mit AnnexinV und PI gefärbt und im FACS analysiert. Stellvertretend ist diese Färbung von aus der Milz isolierten Zellen für alle drei Gruppen nach neun Tagen aHP in Abbildung 24D dargestellt.

Zur Analyse wurde der Prozentsatz der toten (PI und AnnexinV doppelt-positiven) 2C TCRtg T-Zellen auf 100% gesetzt. Somit ergab sich für die 2C PD1^{-/-} T-Zellen ein Wert von 240%, und für die 2C PD1tg T-Zellen ein Wert von 200%. D.h. sowohl PD1-knockout als auch PD1-transgene T-Zellen gingen im lymphopenen Empfänger verstärkt in den programmierten Zelltod (Abb. 24D).

Die geringere Ausbeute an 2C PD1tg aHP T-Zellen lag somit nicht nur an einem verstärkten Absterben der 2C PD1tg aHP T-Zellen, zumindest basierend auf den Daten der PI-Färbung. Wir gehen daher davon aus, dass PD-1 vielmehr schnell proliferierende aHP T-Zellklone hemmt.

Im Gesamtergebnis wird die Anzahl der aHP T-Zellen durch die Überexpression von PD-1 also verringert. Dies lässt den Schluss zu, dass PD-1 eine restriktive Funktion bei der Homöostatischen Proliferation zukommt, und dass v.a. T-Zellen, die unter Umständen zu einer zu starken Autoimmunreaktion fähig sind, über diesen Mechanismus gehemmt werden.

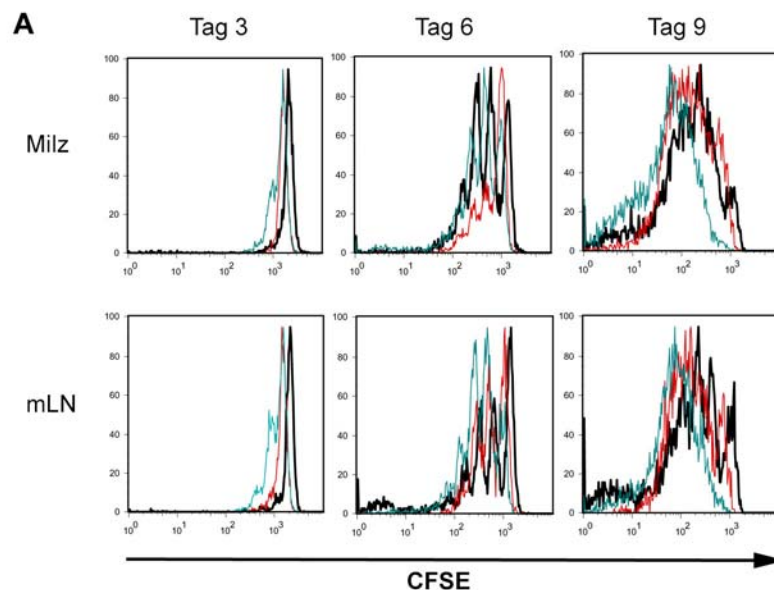
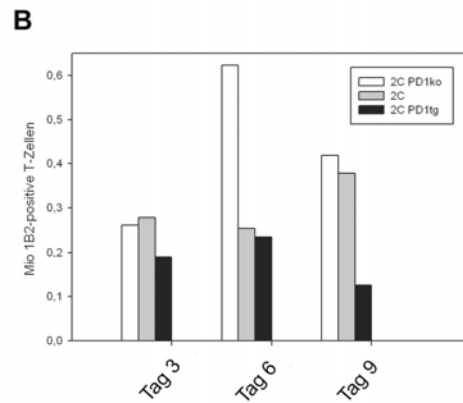
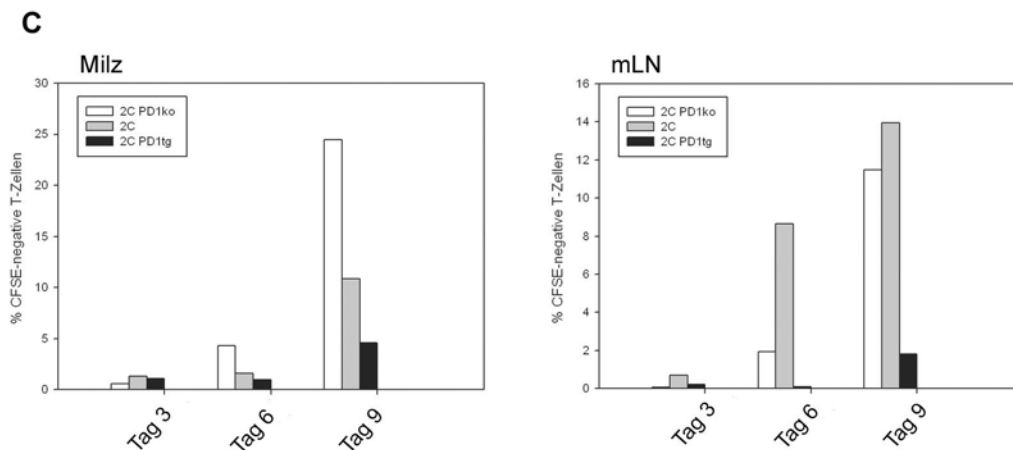


Abbildung 24: PD-1 besitzt eine restriktive Funktion bei der aHP von 2C T-Zellen

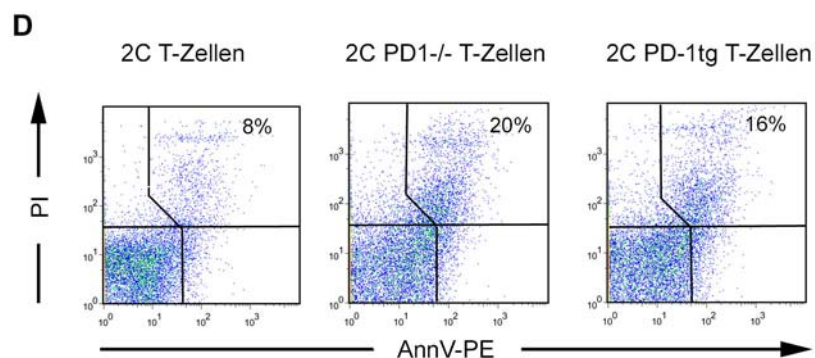
A) Pro RAG2^{-/-} Maus wurden 5×10^6 2C, 2C PD1^{-/-} oder 2C PD1tg CFSE-markierte T-Zellen retrobulbär gespritzt. Zu den angegebenen Zeitpunkten erfolgte die Entnahme von Milz und mLN, welche jeweils getrennt zu Einzelzellsuspensionen verarbeitet wurden. Die einzelnen Proben wurden für die FACS-Analyse mit anti-1B2-APC, anti-CD3-PE und PI gefärbt. Das Gate wurde auf die PI negativen (lebenden), 1B2- und CD8-positiven T-Zellen gesetzt. Die Histogramme zeigen die CFSE-Ausverdünnung im Verlauf der Proliferation der T-Zellen. 2C T-Zellen sind als schwarzes Histogramm dargestellt, 2C PD1^{-/-} T-Zellen als blaues, und 2C PD1tg T-Zellen als rotes Histogramm.



B) Aus der Lebendzellzahl (ermittelt mit Hilfe der Trypanblaufärbung) und des Prozentsatzes der 1B2-positiven T-Zellen (ermittelt durch eine FACS-Analyse) wurde die Gesamtzahl an 1B2-positiven T-Zellen für die 2C, 2C PD1^{-/-} oder 2C PD1tg T-Zellpopulationen bestimmt.



C) Zusätzlich wurden für die Histogramme von Abb. 24A die Prozentsätze der 1B2-positiven, schnell proliferierenden und daher bereits CFSE-negativen T-Zellen in der FACS-Analyse bestimmt.



D) 2C PD1tg und 2C PD1^{-/-} aHP T-Zellen zeigen verstärktes Absterben während der aHP

Einzelzellsuspensionen der Milzen von aHP 2C, 2C PD1tg und 2C PD1^{-/-} Mäusen wurden zunächst wie beschrieben für eine FACS-Analyse mit anti-1B2-APC gefärbt. Die Zellen wurden anschließend in Bindingbuffer aufgenommen und kurz vor der Messung mit AnnexinV-PE und PI gefärbt. Eine Dotplotanalyse der 1B2-positiven T-Zellen, bei welcher AnnexinV-PE gegen PI dargestellt ist, ermöglicht die Unterscheidung zwischen lebenden (AnnexinV und PI doppelt-negativen), toten (AnnexinV und PI doppelt-positiven) sowie apoptotischen T-Zellen (AnnexinV-positiv und PI-negativ).

IV. Diskussion

1. Induktion der LIP im Mausmodell unter chronisch- und akut-lymphopenen Bedingungen

Zur phänotypischen und funktionellen Charakterisierung homöostatisch proliferierender muriner polyklonaler bzw. transgener T-Zellen wurden im Rahmen dieser Arbeit für unser Labor zunächst die Induktion der Lymphopenie-induzierten Proliferation (LIP) von T-Zellen sowohl unter chronisch-lymphopenen als auch unter akut-lymphopenen Bedingungen etabliert.

Für transgene T-Zellen konnte ich die homöostatische Proliferation in Einklang mit anderen Gruppen mittels CFSE-markierten 2C TCRtg T-Zellen nach Transfer in die chronisch-lymphopene RAG2^{-/-} Maus darstellen (Cho et al., 2000; Murali-Krishna and Ahmed, 2000). Neben transgenen T-Zellen zeigten auch polyklonale T-Zellen nach Transfer in einen lymphopenen Empfänger eine Lymphopenie-induzierte Proliferation. In Übereinstimmung mit der Literatur war bei diesen Experimenten eine langsamere LIP der CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zu den CD8⁺ T-Zellen zu beobachten (Maury et al., 2001) (Abb. 1).

Ich konnte sowohl bei der LIP CD4⁺ als auch CD8⁺ polyklonaler T-Zellen eine Population CFSE-negativer T-Zellen beobachten. Diese T-Zellen müssen sich viel häufiger geteilt haben als die T-Zellen, die im Histogramm zu den einzelnen CFSE-steps gehören. Ein plötzlicher Verlust des CFSE nach Transfer z.B. durch Stoffwechselprozesse ist kaum denkbar, da das CFSE kovalent an Makromoleküle der markierten Zellen gebunden ist (Weston and Parish, 1990). Da sich diese beiden T-Zellpopulationen neben ihrer unterschiedlichen Proliferationsgeschwindigkeit auch in ihrer Abhängigkeit von IL-7 unterscheiden (Min et al., 2005), übernehmen wir in Anlehnung an andere Arbeiten deshalb die Unterteilung der LIP polyklonaler T-Zellen in zwei unterschiedlich schnell ablaufende proliferative Immunantworten: Die langsam ablaufende sog. (akute) Homöostatische Proliferation ((a)HP) und die viel schnellere sog. Burst-like (Endogene, Spontane) Proliferation, kurz BLP, genannt (Min et al., 2004; Min and Paul, 2005; Min et al., 2005).

Wie Moses et al. bzw. Troy und Shen zeigen auch meine Experimente, dass die in der P14 TCRtg/RAG2^{-/-} Maus vorhandenen T-Zellen zwar die langsame aHP, nicht jedoch die BLP inhibieren können (Moses et al., 2003; Troy and Shen, 2003). Auch dies spricht für zwei eigenständige proliferative Immunantworten (Abb. 1).

Die BLP konnte dagegen nur durch das komplexe TCR-Repertoire einer Wildtypmaus unterdrückt werden (Abb.2). Min schlägt für die Regulation der BLP das sog. „hole in the repertoire“-Modell vor und postuliert, dass neu transferierte T-Zellen in einem Empfänger nur dann endogen proliferieren können, wenn ihre Spezifität nicht schon durch vorhandenen Memory T-Zellen abgedeckt ist. In dem sehr komplexen TCR-Repertoire einer Wildtypmaus gibt es somit kaum BLP zu verzeichnen (Min and Paul, 2005).

Chronisch-lymphopene Bedingungen sind jedoch sehr artifiziell, um die LIP zu untersuchen, da RAG2^{-/-} Mäuse genetisch bedingt weder T- noch B-Zellen, sowie im Vergleich zu Wildtypmäusen sehr kleine Lymphknoten mit veränderter Architektur besitzen (Shinkai et al., 1992). Darum habe ich die Induktion der LIP von T-Zellen für unser Labor zusätzlich in Einklang mit Tan et al. in einem Modell etabliert, welches eher klinischen Bedingungen entspricht. Für dieses Modell werden die verwendeten Wildtypmäuse erst vor dem T-Zelltransfer durch Bestrahlung akut-lymphopen gemacht (Tan et al., 2002). Trotzdem weist auch dieses Modell Nachteile auf. So ist z.B. eine Deletion der APC möglich, wodurch die MHC-Präsentation insgesamt und somit auch die self-Peptid Präsentation eingeschränkt wird. Zudem entsteht durch die Bestrahlung evtl. ein sog. „cytokine storm“ von proinflammatorischen Zytokinen wie z.B. IL-12 (Bracci et al., 2007). Dabei ist dieser „cytokine storm“ nicht gleichzusetzen mit einem verbesserten Zugang zu homöostatischen Zytokinen wie IL-7 oder IL-15 (Moses et al., 2003).

In Übereinstimmung mit anderen Gruppen wurde trotz dieser möglichen Unterschiede des chronisch- bzw. des akut-lymphopenen Mausmodells für die aHP von transferierten monoklonalen 2C TCRtg bzw. von polyklonalen CD8⁺ T-Zellen in beiden Lymphopeniemodellen eine vergleichbare aHP bezüglich der proliferativen Kapazität bzw. der Oberflächenmarkerexpression beobachtet (Cho et al., 2000; Ge et al., 2002; Murali-Krishna and Ahmed, 2000; Tan et al., 2002). Wir gehen deshalb davon aus, dass unsere Ergebnisse für die aHP, die in dem einen oder dem anderen Modell entstanden, durchaus austauschbar sind. Generell sollten jedoch beim Vergleich von Daten zur LIP nicht nur die verwendeten Modellsysteme miteinander verglichen werden, sondern es sollten auch z.B. die Dauer der LIP-Experimente, Alter der Empfängertiere, verschiedene

Tierstallbedingungen, sowie Art und Gewinnung der transferierten Zellpopulationen etc. berücksichtigt werden, um mögliche Unterschiede zwischen den einzelnen Daten erklären zu können.

Das Auftreten der BLP polyklonaler CD8⁺ T-Zellen konnte sowohl unter chronisch- als auch unter akut-lymphopenen Bedingungen beobachtet werden. Allerdings zeigte sich die BLP unter akut-lymphopenen Bedingungen in abgeschwächter Form (Abb.1 und Abb. 2).

Nach wie vor ist umstritten, ob die BLP ähnlich wie die aHP von self-Peptiden abhängig sind, oder ob es sich in diesem Fall um eine Antwort auf Fremdantigene handelt. Surh et al. sehen die Ursache dieser schnellen proliferativen Immunantwort in der bakteriellen Darmflora der Empfängertiere und der sich daraus ableitenden Fremdpeptide. Chronisch-lymphopene Tiere besitzen eine veränderte Darmflora und auch akut-lymphopene Empfängertiere tragen aufgrund von möglichen Bestrahlungsschäden eine erhöhte Menge an Fremdantigen im Darm (Bourgeois and Stockinger, 2006; Kieper et al., 2005; Moses et al., 2003). In Übereinstimmung mit der Gruppe um Surh zeigten meine Ergebnisse jedoch, dass die BLP verstärkt nach T-Zelltransfer in chronisch-immundefiziente Tiere stattfand, und weniger stark in bestrahlten Tieren auftrat. Der jeweilige Immunstatus des Empfängertieres scheint also die BLP der transferierten naiven T-Zellen beeinflussen zu können, wohingegen die aHP in beiden Systemen gleichermaßen unterstützt wird (Kieper et al., 2005).

Gegen eine Aktivierung der BLP T-Zellen durch Fremdantigen spricht die Beobachtung, dass auch durch das dem Trinkwasser der Versuchstiere zugesetzte Antibiotikum Cotrimazol kein Rückgang der BLP zu verzeichnen war. Im Gegensatz zu diesen Daten konnten Kieper et al. jedoch sehr wohl eine Reduktion der BLP nach Antibiotikagabe erzielen (Kieper et al., 2005), die Gruppe um Min und Paul sah dadurch jedoch kaum eine Verminderung der BLP. Auch der später diskutierte unterschiedliche Phänotyp von BLP und antigenstimulierten T-Zellen unterstreicht eine Abgrenzung der BLP T-Zellen von konventionellen Effektorzellen, die nach Kontakt mit Fremdantigen entstehen (vgl. II). Zudem wird teilweise auch eine schnelle Proliferation von transgenen T-Zellen beschrieben, die aufgrund der Spezifität der jeweiligen T-Zellen nicht mit dem Erkennen eines Fremdantigens erklärt werden kann (Troy and Shen, 2003). Wie Min und Paul gehe ich deshalb davon aus, dass die BLP ähnlich wie die aHP von self-Peptiden abhängig ist, gebildet aus endogenen Proteinen (Min et al., 2005).

Eine der BLP ähnlich schnelle, proliferative Immunantwort unter Lymphopenie wurde kürzlich beschrieben. Sie scheint IL-2-vermittelt zu sein. Wie die BLP ist diese schnell ablaufende Form der Homöostatische Proliferation abhängig von MHC-Kontakten, jedoch unabhängig von IL-7. Stattdessen reagieren diese T-Zellen auf erhöhte IL-2 Mengen mit einer schnellen Proliferation (Cho et al., 2007). Möglicherweise besitzen auch chronisch-lymphopene Mäuse einen erhöhten IL-2-Spiegel, was eine verstärkte BLP gegenüber den akut-lymphopenen Empfängertieren erklären könnte.

2. Der Phänotyp von aHP T-Zellen und BLP T-Zellen

In dieser Dissertation gelang eine Erweiterung und umfassende Darstellung der Expression von Adhäsionsmolekülen, Zytokinrezeptoren und anderen Oberflächenmolekülen sowohl der aHP als auch der BLP T-Zellen, stets im Vergleich zu naiven bzw. zu *in vitro* stimulierten Effektor T-Zellen. Für die transgenen 2C T-Zellen konnte folgender aHP Phänotyp bestimmt werden: Starke Expression der Adhäsionsmoleküle CD62L und CD44 sowie des Memory-Markers Ly6C; zudem werden auch die Rezeptoren für die homöostatischen Zytokine IL-7 (CD127) und IL-15 (CD122) auf den aHP T-Zellen exprimiert, im Gegensatz zum Rezeptor für IL-2 (CD25) und dem PD1-Rezeptor, welche beide nicht auf der Oberfläche von aHP T-Zellen vorkommen. Der Ligand für PD-1, PDL-1, wird jedoch auf den T-Zellen exprimiert (Abb.4). Somit bestätigen und erweitern unsere Daten den von Murali-Krishna als „Memory-like“ bezeichneten Phänotyp (Murali-Krishna and Ahmed, 2000). Insgesamt kann dieser aHP Phänotyp beschrieben werden durch ein Expressionsmuster von Oberflächenmolekülen, welches zwischen dem einer naiven (CD62L, CD127, CD25 und PD-1) und dem einer Effektor T-Zelle (CD44, CD122 und Ly6C) liegt.

In der Literatur wurden bisher stets nur wenige Oberflächenmarker verwendet, um LIP T-Zellen von anderen T-Zellpopulationen abzugrenzen. Meist wurde eine Markerkombination verwendet, bestehend aus CD44 und CD122, teilweise auch CD127 (Cho et al., 2000; Goldrath et al., 2000), seltener wurde auch Ly6C verwendet, ein Marker für klassische Memory T-Zellen (Murali-Krishna and Ahmed, 2000), und nur in drei Veröffentlichungen wird CD62L für die Charakterisierung der LIP T-Zellen benutzt (Gudmundsdottir and Turka, 2001; Maury et al., 2001; Murali-Krishna and Ahmed, 2000).

Durch die Unterteilung der LIP von polyklonalen T-Zellen (Abb.5) gelang eine Charakterisierung der polyklonalen aHP T-Zellen in Abgrenzung zu den BLP T-Zellen. Der aHP Phänotyp der 2C T-Zellen konnte dabei für die polyklonalen CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellpopulationen bis auf kleinere Abweichungen bestätigt werden. Es zeigte sich jedoch, dass aHP und BLP T-Zellen unterschiedliche Muster von Oberflächenmolekülen tragen und sich somit voneinander abgrenzen. So besitzen sowohl CD8⁺ als auch CD4⁺ BLP T-Zellen im Gegensatz zu aHP T-Zellen keine CD62L- und eine teilweise stark verringerte CD127-Expression. PD-1 wird dagegen stärker von BLP T-Zellen exprimiert als von aHP T-Zellen (Abb. 6 und 7). Gleichzeitig ist der BLP Phänotyp jedoch eindeutig von *in vitro* repetitiv stimulierten polyklonalen T-Zellen abgrenzbar, und unterscheidet sich auch von T-Zellen, die *in vivo* mit Alloantigen in Kontakt kamen (Maury et al., 2001). Vor allem zeigten die BLP T-Zellen keine ausgeprägte Expression von CD25, einem Oberflächenmarker, der sowohl bei *in vitro* als auch bei *in vivo* mit Fremdanitgen stimulierten T-Zellen verstärkt exprimiert wird.

Auch die NHP T-Zellen wurden als eigene Population analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass diese T-Zellen nach wie vor die Oberflächenmarker einer naiven T-Zelle exprimieren. Der Zelltransfer allein bewirkt also noch keine Änderung von naiven zum aHP Phänotyp. Somit sollten diese T-Zellen auch nicht in die Analyse des aHP Phänotyps einbezogen werden.

3. Der aHP Phänotyp ist stabil und transplantabel

Der einmal induzierte aHP Phänotyp für transgene 2C T-Zellen ist unter lymphopenen Bedingungen für mindestens 65 Tage stabil (Abb.4). Die Literatur liefert jedoch widersprüchliche Erkenntnisse zur Stabilität dieses aHP Phänotyps. So beschreiben Murali-Krishna und Ahmed den „Memory-like phenotype“ transgener T-Zellen sogar über einen Zeitraum von bis zu 150 Tagen nach Transfer in einen lymphopenen Empfänger als stabil (Murali-Krishna and Ahmed, 2000). Auch die Arbeit von Cho et al. unterstützt die Theorie, dass der aHP Phänotyp unter lymphopenen Bedingungen stabil ist. Eine Veröffentlichung von Goldrath et al. sieht allerdings nach 20 bis 30 Tagen unter lymphopenen Bedingungen zusätzlich einen weiteren Phänotypwechsel vom „Memory-like“ Zustand der transferierten T-Zellen zurück zu ihrem ursprünglich naiven Status (Cho et al., 2000; Goldrath et al., 2000). Dieser erneute Phänotypwechsel wurde jedoch nur bei

bestrahlten Wildtypmäusen als Empfängertieren nachgewiesen, nicht aber bei RAG^{-/-} Mäusen, deren transferierte T-Zellen den einmal induzierten aHP Phänotyp beibehielten (Goldrath et al., 2000). Ge et al. konnten jedoch nachweisen, dass es sich bei den von Goldrath beobachteten naiven T-Zellen um RTE (recent thymic emigrants) handelt, die aus in der transferierten Splenozytenpopulation enthaltenen HSC (hematopoietic stem cells) in den Wildtyp-Empfängermäusen neu gebildet werden können. Diese Neubildung naiver T-Zellen ist möglich, da die subletal bestrahlten Wildtyptiere im Gegensatz zu RAG^{-/-} Mäusen eine intakte T-Zellreifung besitzen (Ge et al., 2002). Goldrath verwendet für ihre Versuche keine aufgereinigten naiven T-Zellen wie ich sie in meinen Versuchen eingesetzt habe, sondern Zellsuspensionen von Milz- bzw. Lymphknotenzellen, in welchen eben auch Vorläuferzellen enthalten sein können, die dann zu naiven T-Zellen ausdifferenzieren. Berücksichtigt man die verschiedenen Bedingungen, unter welchen die Versuche von Goldrath, Cho, Murli-Krishna und unserer eigenen Gruppe durchgeführt wurden, so kann man feststellen, dass der Transfer aufgereinigter naiver T-Zellpopulationen in einen chronisch-lymphopenen Empfänger zur aHP führt, und dass die naiven T-Zellen mehrheitlich einen stabilen aHP Phänotyp entwickeln.

In Einklang mit diesen Beobachtungen sind aHP T-Zellen zudem auch unter akut-lymphopenen Bedingungen mindestens 30 Tage lang stabil, wenn eine aufgereinigte naive T-Zellpopulation verwendet wird (Ge et al., 2002).

Langzeitversuche zur Stabilität von polyklonalen LIP T-Zellen im lymphopenen Empfänger wurden in dieser Arbeit nicht durchgeführt. Eine Trennung der aHP und BLP Fraktionen sowohl im akut- als auch im chronisch-lymphopenen Modell ist nur begrenzt möglich, da nach Ausverdünnen des CFSE die einzelnen LIP-Populationen nicht mehr identifizierbar sind. Die LIP von CD4⁺ T-Zellen zeigte jedoch im Rahmen der Colitisexperimente, dass nach mehreren Wochen LIP der Anteil an BLP-Zellen, gekennzeichnet durch die fehlende CD62L-Expression, deutlich überwiegt. Dies könnte an der sehr viel höheren Proliferationsrate von BLP T-Zellen liegen, so dass die aHP T-Zellen überwachsen werden.

Als nächstes stellte sich natürlich die Frage, ob dieser Phänotyp nur unter lymphopenen Bedingungen stabil ist, oder ob das induzierte Muster der Oberflächenmarkerexpression nach einem Transfer in einen nicht-lymphopenen Empfänger erhalten bleibt.

Ich konnte zeigen, dass 2C TCRtg T-Zellen, die nach vier Wochen aHP von einer RAG2^{-/-} Maus in einen nicht-lymphopenen Empfänger transferiert wurden, den aHP Phänotyp auch

über einen Zeitraum von weiteren vier Wochen beibehielten (Abb. 8). In Übereinstimmung mit unseren Daten berichtet auch Ge, dass aHP T-Zellen ihren Status-quo nach Transfer in eine Wildtypmaus mindestens 30 weitere Tage aufrecht erhalten (Ge et al., 2002).

Es ist bekannt, dass T-Zellen nicht nur die Expression der Oberflächenmarker während der aHP verändern, sondern auch andere funktionelle Eigenschaften als naive T-Zellen entwickeln. So erkennen aHP TCRtg T-Zellen ihr spezifisches Antigen besser und produzieren zudem verstärkt IFN- γ nach Kontakt mit Fremdanigen (Goldrath and Bevan, 1999a; Murali-Krishna and Ahmed, 2000).

Hinweise darauf, dass nicht nur phänotypische, sondern auch funktionelle Eigenschaften der LIP bzw. aHP T-Zellen nach Induktion von der Lymphopenie entkoppelbar sind, lieferte in der Literatur ein Mausmodell zur Herztransplantation. In diesem Modell wurde gezeigt, dass ein transplantiertes Herz abgestoßen wird, wenn einer nicht-lymphopenen Wildtypmaus nach der Herztransplantation zusätzlich LIP T-Zellen transferiert wurden. Die Abstoßung unterblieb jedoch, wenn anstelle der LIP T-Zellen naive T-Zellen verwendet wurden, die in der Wildtypmaus nicht homöostatisch proliferieren konnten (Wu et al., 2004). Während der LIP erworbene Eigenschaften, in diesem Fall die stark verminderte Toleranz gegenüber dem Transplantat, können also nach Induktion auch in nicht-lymphopene Empfängertiere transferiert werden (Neujahr et al., 2006; Taylor et al., 2004; Wu et al., 2004).

In Einklang mit diesen Daten konnte auch ich im Rahmen dieser Dissertation sowohl im Tumormodell mit transgenen 2C T-Zellen als auch im Transfercolitismodell mit polyklonalen CD4⁺ T-Zellen zeigen, dass einmal induzierte funktionelle Eigenschaften der aHP bzw. der LIP T-Zellen von der Lymphopenie entkoppelt werden können.

Im Detail konnte Folgendes beobachtet werden:

Im 2C Tumormodell können naive 2C TCRtg T-Zellen unter lymphopenen Bedingungen akut homöostatisch proliferieren und allogene oder syngene Tumoren abstoßen. Im nicht-lymphopenen Empfängertier findet dagegen nach Transfer naiver 2C TCRtg T-Zellen keine Tumorkontrolle statt (Brown et al., 2006). Ich konnte nun zeigen, dass 2C TCRtg T-Zellen des aHP Phänotyps die Fähigkeit zur Abstoßung eines Tumors unter lymphopenen Bedingungen beibehalten, wenn diese in eine nicht-lymphopene P14 TCRtg/RAG2^{-/-} Maus transferiert wurden. Auch in dieser Maus konnte das Tumorstadium kontrolliert werden (Abb.15). Das bedeutet, die aHP 2C T-Zellen haben unter lymphopenen Bedingungen die Fähigkeit erworben, die Selbsttoleranz zu brechen, und behalten diese Eigenschaft auch in einer nicht-lymphopenen Umgebung bei.

Die Veränderungen von der naiven zur aHP T-Zelle sind dabei nicht einfach gleichzusetzen mit einer vorangehenden Aktivierung durch Fremdanitgen, denn wie bei diesem Experiment ferner gezeigt werden konnte, kontrollierten *in vitro* antigenstimulierte T-Zellen das Wachstum des Tumors weder in einer RAG2^{-/-} noch in einer P14 TCRtg/RAG2^{-/-} Maus, obwohl diese T-Zellen ähnliche Effektoreigenschaften wie aHP T-Zellen aufweisen (Blank, unveröffentlichte Daten).

Antigenstimulierte T-Zellen proliferieren nach Antigenkontakt wesentlich stärker als aHP T-Zellen (Murali-Krishna and Ahmed, 2000). Dabei verstärken sich zwar die Effektoreigenschaften, gleichzeitig aber zeigen diese voll ausdifferenzierten, antigenstimulierten Effektorzellen auch ein verändertes Migrationsmuster, welches das Einwandern in entzündetes Gewebe etc. ermöglicht, jedoch den Zugang zu den sekundären Lymphorganen (SLO) verwehrt (Sallusto et al., 1999; Wherry et al., 2003). Möglicherweise erhalten die Effektorzellen durch diese veränderten Homing-Eigenschaften nicht genügend Überlebenssignale z.B. in Form von IL-7, einem Zytokin, welches von den sog. FRC (fibroblastic reticular cells) in den T-Zellzonen der SLO produziert wird (Link et al., 2007). Denkbar wäre auch, dass Effektorzellen sich aufgrund ihrer vorangegangenen starken Proliferation in einem Zustand der replikativen Seneszenz befinden. Ein Kennzeichen für diesen erschöpften Zustand ist z.B. die Länge der Telomere, denn je häufiger sich Zellen teilen, umso kürzer werden diese (Klebanoff et al., 2006).

Um auch für polyklonale T-Zellen bestätigen zu können, dass die Eigenschaften von LIP T-Zellen transplantabel sind, haben wir das Transfercolitismodell verwendet, ein System, in welchem die Auswirkungen von aHP und BLP unabhängig voneinander betrachtet werden können.

In RAG2^{-/-} Mäusen fand sowohl aHP als auch BLP der naiven, transferierten CD4⁺ T-Zellen statt, in der P14 TCRtg/RAG2^{-/-} Maus dagegen wurde die aHP durch den CD8⁺ transgenen T-Zellklon gehemmt, und es konnte nur BLP stattfinden. Parallel dazu wurde nur in den RAG2^{-/-} Mäusen, jedoch nicht in P14 TCRtg/RAG2^{-/-} Mäusen eine Colitis induziert (Abb.9). Dies erlaubte die Folgerung, dass die aHP- und nicht die BLP-Fraktion der LIP T-Zellen für die Colitisinduktion nötig ist.

Bisher ging man im Transfercolitismodell von folgenden drei Hauptfaktoren aus, welche Colitis auslösen: LIP von CD4⁺ T-Zellen, der Einfluss von Zytokinen und eine intakte Darmflora des Empfängers (Maloy and Powrie, 2001). Eine Colitisinduktion durch Reaktion von CD4⁺ polyklonalen T-Zellen auf im Darm vorhandene Fremdanitgene ließe

jedoch eher auf eine Beteiligung der BLP-Population schließen (Kieper et al., 2005). Insofern ist unsere Beobachtung, dass die aHP für die Colitisinduktion nötig ist, überraschend. Unterstützend für unsere Beobachtung sind allerdings neuere Daten, die zeigten, dass keine Colitisinduktion stattfand, wenn $CD4^+CD45RB^{hi}$ T-Zellen in einer $IL7^{-/-}$ $RAG^{-/-}$ Maus transferiert wurden (Totsuka et al., 2007). Da nur die aHP der T-Zellen von IL-7 abhängig ist, die BLP jedoch auch stattfinden kann, wenn kein IL-7 vorhanden ist, sind diese kürzlich publizierten Daten im Einklang mit unseren Beobachtungen, dass die aHP-Fraktion für das Initiieren einer Colitis nötig ist. Auch die unterschiedliche CD127-Expression auf aHP bzw. BLP T-Zelle passt zu dieser Beobachtung, denn auf aHP T-Zellen ist der Rezeptor für IL-7 deutlich exprimiert, wohingegen ca. die Hälfte der BLP T-Zellen diesen Rezeptor nicht mehr tragen (Abb.7).

Mit Hilfe dieses etablierten $CD4^+$ T-Zellvermittelten Autoimmunmodells konnte ich schließlich zeigen, dass polyklonale $CD4^+$ LIP T-Zellen auch nach Transfer in einen nicht-lymphopenen Empfänger die Selbsttoleranz brechen können, und eine Colitis induzieren (Abb. 10). Dabei ließen sich LIP T-Zellen nicht mehr durch die Anwesenheit des transgenen T-Zellklons in der P14 TCRtg/ $RAG2^{-/-}$ Maus regulieren.

4. LIP T-Zellen werden unabhängig von der Co-Stimulation via CD28, bleiben aber durch regulatorische T-Zellen kontrollierbar

Als möglicher Grund für das veränderte Verhalten der T-Zellen nach LIP konnte die Unabhängigkeit dieser T-Zellen von der Co-Stimulation via CD28 identifiziert werden. Im Gegensatz zu einer konventionellen proliferativen Immunantwort naiver T-Zellen benötigt die aHP T-Zelle neben Kontakt des TCR mit einem peptidbeladenen MHC keine weiteren Signale mehr (Prlic and Jameson, 2002).

Wie anhand des Transfercolitismodells gezeigt werden konnte, produzieren aufgereinigte LIP T-Zellen *in vitro* relevante Mengen an IL-2 auch ohne eine Co-Stimulation über CD28 (Abb. 11). Kommen LIP T-Zellen dann erneut in Kontakt mit einem MHC-Komplex, so könnte eine Reaktion dieser LIP T-Zellen viel schneller und stärker erfolgen, als wenn zusätzlich noch eine Co-Stimulation nötig wäre.

Auch $CD8^+$ T-Zellen mit einem knockout für CD28 sind im Vergleich zu Wildtypzellen nicht in ihrer Fähigkeit beeinträchtigt, unter lymphopenen Bedingungen zu proliferieren, selbst dann nicht, wenn der Transfer in lymphopene Mäuse erfolgt, welche einen

zusätzlichen Defekt für ein weiteres co-stimulatorisches Molekül wie CD40L bzw. 4-1BBL besitzen (Prlic et al., 2001).

Diese Unabhängigkeit von der Co-Stimulation kann allerdings dazu führen, dass LIP T-Zellen zu starken Autoimmunreaktionen führen. Somit stellte sich die Frage nach einem Regulationsmechanismus für LIP T-Zellen. Über diesen Mechanismus sollten T-Zellen, welche die Fähigkeit zum Überwinden der Selbsttoleranz besitzen nach wie vor gebremst werden können, um unerwünschte Autoimmunreaktion wie die Transfercolitis zu verhindern. Im Rahmen einer Tumorthherapie könnte dieser Regulationsmechanismus zudem gezielt ausgeschaltet werden, wenn es darum geht, eine erwünschte Tumorreaktion zu verstärken.

Bekannt war in der Literatur bisher, dass regulatorische T-Zellen sowohl eine Colitisinduktion durch naive $CD4^+ CD45RB^{hi}$ T-Zellen verhindern, als auch eine bereits bestehende Colitis heilen können (Mottet et al., 2003; Sakaguchi et al., 1995). Deshalb sollte nun untersucht werden, ob Treg Zellen zudem in der Lage sind, auch eine Transfercolitis durch LIP $CD4^+$ T-Zellen zu unterdrücken.

Ein einzelner T-Zellklon reichte zwar aus, um die aHP naiver T-Zellen und gleichzeitig eine Colitisinduktion zu unterdrücken (Abb. 10), eine vollständige Unterdrückung der LIP T-Zellen war jedoch nur in einem komplexen TCR Repertoire mit Treg möglich (Abb. 12). Co-Transferexperimente mit Treg Zellen bestätigten im Rahmen dieser Arbeit die Hypothese, dass transferierte LIP T-Zellen in der Wildtypmaus durch die Anwesenheit von regulatorischen T-Zellen supprimiert werden. So konnte der Co-Transfer von Treg mit LIP T-Zellen in P14 TCRtg/RAG2^{-/-} Mäusen eine Colitisinduktion verhindern (Abb. 13).

5. Identifizierung von CD62L und PD-1 als funktionell relevante Moleküle für die aHP

Mit Hilfe der FACS-Analyse des aHP Phänotyps konnte ich im Rahmen dieser Doktorarbeit die beiden Moleküle CD62L und PD-1 als charakteristische Oberflächenmarker dieses Phänotyps identifizieren. Deshalb wurden CD62L und PD-1 auch im Hinblick auf ihre jeweilige funktionelle Relevanz bezüglich der aHP untersucht.

Durch die Verwendung von T-Zellen mit einem Defekt für CD62L konnte ich zeigen, dass L-Selektin nötig ist, damit T-Zellen überhaupt an den Ort der aHP gelangen können, denn dieses Adhäsionsmolekül ist an der Homing-Kaskade für das Einwandern der T-Zellen in die peripheren Lymphknoten beteiligt. Der Einsatz PD-1 transgener T-Zellen zeigte

zudem, dass die Expression des PD-1-Rezeptors begrenzend auf die aHP naiver T-Zellen wirkt.

Im Detail konnte für CD62L Folgendes gezeigt werden:

Um die funktionelle Relevanz des Adhäsionsmoleküls L-Selektin für die aHP zu untersuchen, haben wir Wildtyp T-Zellen mit T-Zellen verglichen, die einen Defekt für die CD62L-Expression besitzen. Obwohl sich Wildtyp und CD62L^{-/-} T-Zellen weder bezüglich ihres TCR V β Repertoires noch im Hinblick auf die untersuchten Oberflächenmarker unterschieden - natürlich mit Ausnahme der CD62L-Expression - (Abb. 16), konnte ich zeigen, dass CD62L^{-/-} T-Zellen im Vergleich zu Wildtyp T-Zellen eine deutlich schwächere und verzögert anlaufende LIP aufwiesen. Um eine Stimulation der LIP durch Fremdanigen auszuschließen, wurden diese Beobachtungen mit transgenen 2C bzw. 2C CD62L^{-/-} T-Zellen überprüft. Auch für transgene 2C CD62L^{-/-} T-Zellen konnte das verzögerte Auftreten der aHP bestätigt werden (Abb. 17).

Überraschenderweise beobachtete ich, dass die wenigen (2C) CD62L^{-/-} T-Zellen, die in den sekundären Lymphorganen vorgefunden wurden, sehr wohl homöostatisch proliferieren konnten. Dies könnte daran liegen, dass CD62L^{-/-} T-Zellen auf einem alternativen Weg in die SLO einwandern, z.B. über die sog. afferenten lymphatischen Bahnen (Steeber et al., 1996). Zum Stellenwert dieses Immigrationsmechanismus gibt es im Mausmodell keine Daten. In Schafen beträgt der Prozentsatz der über afferente Bahnen in die Lymphknoten eingewanderten T-Zellen allerdings bis zu sechs Prozent (Hall and Morris, 1965). Ein zeitlich verzögertes Einwandern in die SLO würde auch das verspätete Anlaufen der LIP von polyklonalen CD62L^{-/-} T-Zellen bzw. der aHP von 2C CD62L^{-/-} T-Zellen erklären: Auch T-Zellen mit einem Defekt für CD62L können homöostatisch proliferieren, sobald sie den Weg in die sekundären Lymphorgane gefunden haben.

Somit erscheint das Homing in die sekundären Lymphorgane über CD62L essentiell zu sein für die initiale Induktion der aHP. Dies unterstreicht auch die um über 50 Prozent reduzierte LIP von CD4⁺ T-Zellen nach Transfer in eine lymphopene Maus, die einen Defekt in der Expression der Liganden SLC und ELC für den CCR7 Rezeptor aufweist. Dieses Molekül ist nach CD62L als erstem Faktor als zweites Molekül an der Homing-Kaskade beteiligt (Ploix et al., 2001).

Die FACS-Analyse der aHP T-Zellen ergab zudem, dass diese T-Zellen den Zelldifferenzierungsmarker Ly6C viel stärker exprimierten als naive oder ausdifferenzierte Effektor T-Zellen. Nur klassische Memory T-Zellen exprimieren Ly6C in vergleichbarer

Stärke. Die Gruppe um Jaakkola konnte zeigen, dass Ly6C am Homing-Prozess beteiligt ist, indem es aktivierend auf das dritte Molekül der Kaskade wirkt, nämlich LFA-1. Die LFA-1-Moleküle werden nach Aktivierung nicht länger vom Zytoskelett der T-Zelle in seiner diffusen Verteilung gehalten, sondern lagern sich zu Clustern zusammen, was wiederum zu einer verbesserten Transmigration der T-Zelle führt (Hanninen et al., 1997; Jaakkola et al., 2003). Neben CD62L verbessert also auch die Expression von CCR7 bzw. Ly6C (in diesem Fall indirekt durch die Aktivierung von LFA-1), die Homing-Eigenschaften von HP T-Zellen in die SLO (Jaakkola et al., 2003; Ploix et al., 2001).

Die Hypothese, dass die SLO für die aHP nötig sind, konnte durch einen Versuch mit bestrahlten $LT\alpha\beta^{-/-}$ Mäusen unterstützt werden, welche weder Lymphknoten noch Peyer's Patches und zudem eine defekte Milzstruktur aufweisen (Alimzhanov et al., 1997; Banks et al., 1995). Wir konnten in diesem System zeigen, dass WT T-Zellen zwar in einer bestrahlten Wildtypmaus, jedoch kaum in einer bestrahlten $LT\alpha\beta^{-/-}$ Maus proliferierten (Abb. 18).

Um den Ort der aHP genauer zu bestimmen, wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten verschiedene Lymphorgane (Milz, mLN, Thymus und Knochenmark) sowie das Blut nach Transfer von CD62L-positiven bzw. CD62L-negativen T-Zellen per FACS-Analyse und per Immunhistologie auf eingewanderte aHP bzw. LIP T-Zellen untersucht. Für die CD62L-positiven T-Zellen konnte im Zeitverlauf beobachtet werden, dass sich sowohl polyklonale LIP als auch transgene aHP T-Zellen in den Lymphknoten ansammelten, wohingegen der Prozentsatz an LIP bzw. aHP T-Zellen in der Milz zu allen analysierten Zeitpunkten nahezu konstant bei ca. drei Prozent blieb (Abb. 19). Für die $CD62L^{-/-}$ T-Zellen wurde in der Milz ein ähnlich konstantes Verhalten beobachtet, in den Lymphknoten dagegen waren sowohl für polyklonale als auch für transgene T-Zellen stets deutlich weniger T-Zellen mit einem Defekt für CD62L zu detektieren (Abb. 20).

Ohne intakte SLO, bzw. ohne das Einwandern von transferierten T-Zellen findet also keine aHP in einem lymphopenen Empfänger statt. Aufgrund der starken Ansammlung der aHP und LIP T-Zellen in den Lymphknoten kann man davon ausgehen, dass es sich bei diesem Kompartiment um den Ort handelt, an welchem die aHP bzw. LIP initiiert wird. Unterstützt wird diese Ansicht durch Daten von Dummer et al., denn auch hier werden die SLO als Ort für die HP naiver T-Zellen genannt. Allerdings konnte die Gruppe ihre Aussage nicht auf das Lymphknotenkompartiment präzisieren (Dummer et al., 2001). Dai und Lakkis dagegen sehen zwar die Notwendigkeit der SLO für $CD4^{+}$, nicht jedoch für $CD8^{+}$ T-Zellen. Mögliche Unterschiede ergeben sich vielleicht aus der Tatsache, dass in

dieser Veröffentlichung die Proliferation der T-Zellen erst nach zehn Wochen untersucht wurde, wohingegen unsere Versuche bereits nach wenigen Tagen LIP beendet wurden, ebenso wie die Experimente von Dummer (Dai and Lakkis, 2001). Daten von Dummer et al. zum Transfer von polyklonalen T-Zellen zeigen ferner, dass T-Zellen nicht mehr homöostatisch proliferieren können, wenn diese zuvor mit Pertussistoxin (PTX) behandelt wurden. Dabei wirkt das PTX über eine Inaktivierung von Chemokinrezeptoren, v.a. CCR7, welche sowohl nötig sind für das Einwandern der T-Zellen in die Lymphknoten als auch in die T-Zellbereiche der Milz, in die sog. weiße Pulpa. T-Zellen können allerdings nach einer PTX-Behandlung weiterhin in die rote Pulpa der Milz einwandern (Dummer et al., 2001).

Kürzlich veröffentlichte Daten weisen darauf hin, dass aHP T-Zellen aufgrund ihrer konstanten L-Selektin-Expression wiederholt CD62L-abhängig in die SLO ein- und auswandern können (Kodera et al., 2008). Diese Eigenschaft steht ganz im Gegensatz zu einer konventionellen T-Zellaktivierung, bei welcher naive T-Zellen ihre CD62L-Expression verlieren. Dies geschieht durch eine membrangebundene Metalloprotease (TACE), welche CD62L in einem sog. „shedding“-Prozess nahe der Transmembrandomäne proteolytisch von der Zelloberfläche abspaltet. Parallel dazu wird zudem die Transkription der L-Selektin mRNA herunterreguliert (Chao et al., 1997; Guarda et al., 2007; Maury et al., 2001; Smalley and Ley, 2005). Die veränderte Expression dieses Adhäsionsmoleküls verhindert weitgehend das Einwandern der aktivierten, CD62L-negativen Effektorzellen via der HEV in die SLO, und verstärkt das Auswandern dieser T-Zellen in entzündetes Gewebe (Weninger et al., 2002).

Im Gegensatz zur aHP naiver T-Zellen wird für die homöostatische Proliferation von Memory T-Zellen das Knochenmark als Ort der HP beschrieben (Becker et al., 2005). Der Memory T-Zellpool wird häufig anhand der unterschiedlichen Expression von CD62L und CCR7 unterteilt in Effektor Memory T-Zellen (TEM; CD62L^{low}, CCR7^{low}) und Central Memory T-Zellen (TCM; CD62L^{hi}, CCR7^{hi}). Aufgrund der Expression dieser Homingmoleküle können zwar die TCM, jedoch nicht die TEM in die SLO einwandern (Sallusto et al., 1999). Trotz der Ähnlichkeit von TCM und aHP T-Zellen bezüglich der Expression ihrer Homingmoleküle, konnte ich nach Transfer naiver T-Zellen in einem lymphopenen Empfänger kaum aHP T-Zellen im Knochenmark vorfinden (Abb. 19). Der Ort der HP für die einzelnen Zellpopulationen scheint also nicht nur von den jeweiligen migratorischen Fähigkeiten dieser Zellpopulationen bestimmt zu werden, sondern möglicherweise auch durch weitere Faktoren wie z.B. verschiedene Zytokine. Das von

naiven T-Zellen für die HP benötigte Zytokin IL-7 wird verstärkt von FRC-Zellen im Lymphknoten produziert (Link et al., 2007), wohingegen im Knochenmark DC evtl. mehr IL-15 produzieren, das Zytokin, von welchem v.a. die HP der CD8⁺ Memory T-Zellen abhängig ist (Becker et al., 2005).

Klinische Relevanz erlangen diese Daten mit der Beobachtung, dass das CD62L-vermittelte Homing von T-Zellen unter lymphopenen Bedingungen auch eine wichtige Rolle für die Tumorabstoßung spielt. Ich konnte mittels *in vivo* Versuchen mit etablierten Tumoren des syngenischen Fibrosarkoms MC57-SIY ind. zeigen, dass das Auswachsen dieses Tumors nur von 2C T-Zellen kontrolliert werden konnte, die CD62L exprimieren (Abb. 22A).

Brown et al. beschrieben, dass die Tumorkontrolle durch 2C T-Zellen von dem Vorhandensein der Lymphopenie abhängt. Deshalb gehe ich davon aus, dass die beobachtete verminderte Tumorkontrolle aus einer verminderten aHP der 2C CD62L^{-/-} T-Zellen resultiert, und nicht auf einem funktionellen Defekt dieser knockout T-Zellen beruht, denn unter *in vitro* Bedingungen konnten sowohl 2C als auch 2C CD62L^{-/-} T-Zellen den MC57-SIY ind. Tumor angreifen (Abb. 22B). Es liegt also kein intrinsischer funktioneller Defekt der CD62L-defizienten 2C-Zellen vor, der es ihnen unmöglich macht, einen Tumor anzugreifen, sondern die mangelnde Tumorkontrolle beruht vielmehr auf dem defekten Einwandern dieser T-Zellen in die Lymphknoten. Beobachtungen von Dummer et al. unterstützen unsere Daten zur ungenügenden Tumorkontrolle durch transferierte CD62L^{-/-} T-Zellen im Maussystem (Dummer et al., 2002).

Das Einwandern von T-Zellen in die Lymphknoten unter lymphopenen Bedingungen ist also auch für eine Tumorabstoßung von entscheidender Bedeutung, denn T-Zellen kommen im Lymphknoten in Kontakt mit DC, welche Tumorantigene präsentieren. Da die aHP T-Zelle zudem ihre Homing-Fähigkeit durch konstante CD62L-Expression behält, kann das Einwandern in den Lymphknoten und somit der Kontakt mit den DC oft wiederholt werden (Kodera et al., 2008).

Wie bereits beim 2C Tumormodell erwähnt, konnte ich zeigen, dass nicht nur CD62L^{-/-} T-Zellen keine ausreichende Tumorkontrolle vermitteln können, sondern dass auch Effektor T-Zellen nach repetitiver *in vitro* Stimulation ein Tumorwachstum nicht kontrollieren können. Gattinoni et al. untersuchten tumorspezifische CD8⁺ T-Zellen mit zunehmendem Differenzierungsstatus nach unterschiedlich langer repetitiver Stimulation, angefangen bei der naiven über die frühe Effektor T-Zelle, bis hin zu Effektor und spätem

Effektor, und stellten dabei fest, dass mit zunehmender Differenzierung der T-Zellen Zytotoxizität und Effektorfunktionen unter *in vitro* Bedingungen besser werden. Gleichzeitig lassen jedoch die für einen *in vivo* anti-Tumoreffekt nötigen Eigenschaften der T-Zellen mit zunehmender Differenzierung nach. Dazu gehören die Fähigkeit, in SLO via CD62L und CCR7 einzuwandern bzw. auf homöostatische Zytokine zu reagieren, oder IL-2 zu produzieren (Gattinoni et al., 2005).

Somit sind unsere Beobachtungen auch für eine klinische Anwendung von Bedeutung, v.a. im Hinblick auf die bislang durchgeführten ACT Studien, für welche die T-Zellen häufig erst nach mehreren Wochen *in vitro* Kultur als voll ausdifferenzierte T-Zellen in den Patienten transferiert wurden (Dudley et al., 2005; Mackensen et al., 2006). Neben kürzeren Expansionszeiten erscheint jedoch mit diesem Hintergrundwissen auch der Einsatz von IL-7, IL-15 bzw. IL-21 anstelle des bisher verwendeten IL-2 sinnvoll, da IL-2 nicht nur tumorreaktive T-Zellen aktiviert, sondern auch die Proliferation von Treg fördert und aktivierte T-Zellen in Apoptose treibt (Dudley and Rosenberg, 2007; Gattinoni et al., 2006; Klebanoff et al., 2005).

Für PD-1 konnte im Zusammenhang mit der aHP Folgendes gezeigt werden:

Das negativ co-stimulatorische Molekül PD-1 wurde in dieser Arbeit als zweites phänotypisches Merkmal der aHP T-Zellen im Hinblick auf seine funktionelle Relevanz für die homöostatische Proliferation untersucht.

Trotz starker Proliferation sind aHP 2C TCRtg T-Zellen fast alle negativ für den PD-1-Rezeptor, und zwar mindestens 65 Tage lang. Im Gegensatz dazu zeigen *in vitro* repetitiv stimulierte 2C T-Zellen eine relativ starke PD-1-Expression (Blank et al., 2004). Allerdings wurde auch bei den aHP T-Zellen stets ein kleiner Prozentsatz von PD-1-positiven T-Zellen detektiert (Abb. 23). Da es sich bei den PD-1-positiven T-Zellen um Zellen handelt, welche sich bereits relativ häufig geteilt haben, könnte man vermuten, dass nur Zellklone mit einem besonders hohen proliferativen Potential verstärkt PD-1 exprimieren. Eine negative Regulation dieser PD-1-positiven Klone wäre denkbar, um eine überschießende HP dieser T-Zellen begrenzen zu können.

Mit Hilfe von PD1-transgenen T-Zellen konnte ich zeigen, dass PD-1 die aHP von transgenen T-Zellen tatsächlich begrenzen kann. Die Überexpression von PD-1 führte zu einer verringerten Ausbeute in der Gesamtzahl der aHP 2C PD1tg T-Zellen. Die CFSE Ausverdünnung war jedoch bei den untersuchten 2C, 2C PD1^{-/-} und 2C PD1tg T-Zellpopulationen durchaus vergleichbar. Die geringere Ausbeute an aHP 2C PD1tg T-Zellen

könnte somit entweder mit einem verminderten Überleben nach Transfer erklärt werden, oder aber mit einem verstärkten induzierten Zelltod dieser T-Zellen bei der aHP. Doppelfärbungen mit AnnexinV und Propidiumjodid ergaben, dass 2C PD1tg T-Zellen unter lymphopenen Bedingungen im Vergleich zu Wildtyp 2C T-Zellen verstärkt absterben. Allerdings ist der Prozentsatz von AnnexinV- und PI- doppelt positiven 2C PD1tg T-Zellen vergleichbar mit dem von 2C PD1^{-/-} T-Zellen. Trotz dieses verstärkten Absterbens war die Gesamtzahl der isolierten aHP 2C PD1^{-/-} T-Zellen an allen untersuchten Tagen am größten (Abb. 24). Daraus kann man folgern, dass die schlechtere Ausbeute an aHP 2C PD1tg T-Zellen im Vergleich zu 2C bzw. zu 2C PD1^{-/-} T-Zellen nicht am verstärkten Absterben dieser T-Zellen liegt, sondern vielmehr an einem geringeren Anteil von stärker proliferierenden, und dadurch CFSE-negativen aHP 2C PD1tg T-Zellen. PD-1 kann somit eine restriktive Funktion bei der Homöostatischen Proliferation zugesprochen werden, da eine Überexpression dieses Rezeptors die Gesamtzahl der aHP T-Zellen verringert. PD-1 wirkt dabei v.a. auf T-Zellen, die ein starkes proliferatives Potential besitzen, und somit unter Umständen zu einer überschießenden Autoimmunreaktion fähig sind.

Auch die Gruppe um Lin sieht während der aHP transgener T-Zellen sowohl PD-1-positive als auch PD-1-negative Zellpopulationen. Die PD-1-positive Fraktion der aHP T-Zellen wird hier als oligoklonale, AnnexinV-positive Population beschrieben, die kaum noch Effektorzytokine wie IFN γ oder TNF α produzieren kann. Diese Beobachtungen sind im Einklang mit unserer Hypothese, dass nur die schnell proliferierenden T-Zellen während der aHP PD-1 positiv werden, und dass die PD-1-Expression ein „Kennzeichen“ für T-Zellen ist, die „exhausted“ werden (Barber et al., 2006). Auch Lin et al. vermuten, dass das Aussortieren von PD-1-positiven T-Zellen möglicherweise Schutz vor autoreaktiven T-Zellklonen darstellt, die im Zuge der aHP entstehen können, wenn einzelne T-Zellen zu stark auf die mit self-Peptiden beladenen MHC-Komplexe reagieren (Lin et al., 2007).

Als weiterer die HP begrenzender Faktor wurde der Fas-Rezeptor beschrieben. Fortner und Budd konnten dabei zeigen, dass aus lymphopenen Empfängertieren vergleichbar mehr homöostatisch proliferierende T-Zellen isoliert werden können, wenn diese T-Zellen defizient für Fas waren (Fortner and Budd, 2005).

Im Rahmen einer ACT ist eine Hemmung der proliferierenden T-Zellen unerwünscht, da eine möglichst starke Expansion der Zellen *in vivo* anzustreben ist. DC und viele Tumoren exprimieren jedoch PDL-1 auf ihrer Oberfläche und führen so zur Anergisierung der T-

Zellen. Obwohl also tumorspezifische T-Zellen im Tumor detektiert werden können, scheinen diese aufgrund supprimierender löslicher Faktoren bzw. membrangebundener Moleküle wie z.B. TGF- β , FAS oder PD-1 nicht in der Lage zu sein, die Tumorzellen erfolgreich zu lysieren (Blank and Mackensen, 2007; Dunn et al., 2002; Iwai et al., 2002; Okazaki and Honjo, 2006).

Lin vergleicht die unter lymphopenen Bedingungen schnell proliferierende, PD-1-positive Population der HP T-Zellen mit den sog. „exhausted“ T-Zellen, wie sie z.B. unter den Bedingungen einer chronischen Virusinfektionen mit LCMV entstehen (Barber et al., 2006; Lin et al., 2007). Solche erschöpften T-Zellen wurden auch bei Menschen mit HIV-, HBV- oder HCV-Infektionen nachgewiesen (Klenerman and Hill, 2005). Verschiedene Studien konnten zeigen, dass diese erschöpften CD8⁺ T-Zellen verstärkt PD-1 exprimieren, und dass die verstärkte Expression dieses Rezeptors funktionell relevant ist: Erfolgt eine Antikörperblockade des PD-1/PDL-1 Signalwegs, so kann der erschöpfte Zustand der T-Zellen aufgehoben werden (Barber et al., 2006; Day et al., 2006; Trautmann et al., 2006; Urbani et al., 2006). Auch PDL-1 exprimierende Tumorzellen erschöpfen tumorspezifischen T-Zellen dauerhaft. Eine Blockierung des PD-1/PDL-1 Signalwegs ist deshalb sowohl für die Behandlung chronischer Infektionen als auch für Tumorthapien von Interesse (Keir et al., 2007).

Allerdings sind die Prozesse, die zum Erschöpfungszustand der virus- bzw. tumorspezifischen oder der aHP T-Zellen führen, sehr verschieden: Bei der chronischen Virusinfektion löst der ständige Kontakt zu stark immunogenem Fremdanigen diese Erschöpfung aus, wohingegen die erschöpften tumorspezifischen T-Zellen dauerhaft mit schwach immunogenen, körpereigenen Antigenen konfrontiert werden (Barber et al., 2006; Blank and Mackensen, 2007), wie es auch für die „erschöpften“ aHP T-Zellen der Fall ist. Trotz dieser unterschiedlichen Ausgangssituation scheint sich der Erschöpfungszustand all dieser T-Zellen in einer verstärkten PD-1-Expression zu zeigen.

Lin et al. konnten auch im Falle der PD-1-positiven aHP T-Zellpopulation zeigen, dass eine Blockierung des PD-1/PDL-1 Signalwegs mit Hilfe eines anti-PDL-1 Antikörpers die erschöpften aHP T-Zellen wieder aktiviert (Lin et al., 2007). Eine Blockade dieses Signalwegs *in vivo* könnte möglicherweise also zu einer verstärkten aHP, und somit zu einer verbesserten Tumorthapie beitragen.

6. Der aHP Phänotyp: Früher Effektor - oder Memory Phänotyp?

Der stabile und transplantable Phänotyp der aHP T-Zellen ist zwar gekennzeichnet durch ein spezielles Expressionsmuster an Oberflächenmarkern, allerdings gelang es auch in dieser Arbeit nicht, ein Molekül zu identifizieren, welches ausschließlich auf aHP T-Zellen exprimiert wird, weder mit einer FACS-Analyse noch mittels der durchgeführten Microarrays mit polyklonalen CD8⁺ T-Zellen, die von Experiment zu Experiment abweichende Ergebnisse lieferten. Auch eine veröffentlichte Microarray-Analyse zum molekularen Programm transgener HP T-Zellen im Vergleich zu naiven und zu Memory T-Zellen lieferte keine weiteren charakteristischen Moleküle (Goldrath et al., 2004).

Allerdings zeigte diese Analyse eine sehr große Übereinstimmung der aHP T-Zellen mit dem Genprofil von klassischen Memory T-Zellen (Goldrath et al., 2004). Dies wirft die Frage auf, wo dieser aHP-Phänotyp einzuordnen ist. Handelt es sich um einen frühen Effektor-Phänotyp, mit Eigenschaften von sowohl naiven als auch antigenaktivierten T-Zellen, oder sind aHP T-Zellen tatsächlich identisch mit klassischen Memory T-Zellen? Bezüglich der Oberflächenmarker tragen aHP T-Zellen neben CD62L auch den Memory-Marker Ly6C. Memory T-Zellen können aufgrund ihrer Adhäsionsmoleküle ähnlich wie naive T-Zellen in die SLO einwandern (Sallusto et al., 1999), allerdings wird als Ort der HP von Memory T-Zellen das Knochenmark postuliert (Becker et al., 2005).

Die Unterteilung des Memory T-Zellpools in Effektor T-Zellen (TEM), die in entzündetes Gewebe einwandern, und in die langlebigen Central Memory T-Zellen (TCM), welche nach wie vor in SLO einwandern können erfolgt allein aufgrund der unterschiedlichen Expressionsmuster für die Adhäsionsmoleküle CD62L und CCR7 (Sallusto et al., 1999). Umstritten ist dabei, ob der Weg von der naiven T-Zelle über die TEM hin zur TCM geht, oder aber ob TCM aus TEM gebildet werden können (Hinrichs et al., 2006). So wurde gezeigt, dass aus CD62L-negativen TEM CD62L-positive TCM entstehen können (Wherry et al., 2003). Für das TCM-TEM Modell sprechen jedoch phänotypische Analysen, die die Ähnlichkeit von naiven und Memory T-Zellen herausstellen, z.B. die Expression für CD62L, CCR7, IL7-R etc. (Gattinoni et al., 2005), sowie die Arbeit von Kedzierska, welche zeigt, dass bereits während einer sehr frühen Phase einer Virusinfektion die TEM-unabhängige Bildung von TCM stattfindet (Kedzierska et al., 2007).

Die von Murali-Krishna gewählte Bezeichnung des „Memory-like phenotype“ ordnet die aHP T-Zellen mehr dem klassischen Memory Phänotyp zu als einem frühen

Effektorphänotyp, auch wenn TCM und TEM im Gegensatz zu aHP T-Zellen nur nach Kontakt mit Fremdanigen entstehen (Murali-Krishna and Ahmed, 2000; Surh and Sprent, 2000). Weitere vergleichende Untersuchungen z.B. der DNA-Methylierung bzw. Histon-Acetylierung von aHP, Effektor und Memory T-Zellen könnten helfen, mögliche Unterschiede bzw. Übereinstimmungen zwischen diesen Zellpopulationen zu identifizieren (Goldrath et al., 2004; Sallusto et al., 2004). Vergleichende Untersuchungen der DNA-Methylierungs- bzw. Histon-Acetylierungsmuster liegen zwar für Th1 und Th2 CD4⁺ T-Zellen vor, für verschiedene CD8⁺ T-Zellpopulationen ist dagegen noch kaum etwas bekannt (Avni et al., 2002; Hinrichs et al., 2006).

Doch unabhängig davon, ob sich eine nahe Verwandtschaft von aHP zu Memory T-Zellen bestätigt oder nicht, so besitzen diese T-Zellen einen Phänotyp, welcher für Tumorthapien große Relevanz erlangen kann. Denn diese T-Zellen können *in vivo* stark expandieren und entsprechende Effektorfunktionen erlangen, ohne dabei die Fähigkeit zu verlieren, repetitiv in die Lymphknoten einwandern zu können, um dort mit entsprechenden Tumorantigenen in Kontakt zu kommen. Ich konnte in dieser Arbeit zeigen, dass der Homing-Rezeptor CD62L dabei eine herausragende Rolle spielt. Zudem können aHP T-Zellen im Gegensatz zu ausdifferenzierten Effektor T-Zellen stark proliferieren, ohne einen vergleichbaren Erschöpfungszustand zu erreichen, welcher u.a. durch eine verstärkte Expression von PD-1 gekennzeichnet ist.

Naive und aHP T-Zellen besitzen zwar vergleichbare Homing-Eigenschaften, aber aHP T-Zellen sind im Gegensatz zu naiven T-Zellen keine ruhenden T-Zellen. Für zukünftige klinische Anwendungen eignen sich HP T-Zellen deshalb sicherlich, um vor Transfer in den Patienten z.B. mittels siRNA oder durch den Einbau eines genetisch veränderten T-Zellrezeptors modifiziert zu werden (Abad et al., 2008).

Dies alles macht HP T-Zellen zu einer interessante Alternative für die bislang in der Klinik eingesetzten *in vitro* stimulierten Effektor T-Zellen, welche meist nur eine unzureichende Tumorkontrolle lieferten (Dudley et al., 2005; Klebanoff et al., 2005; Kodera et al., 2008; Muranski et al., 2006).

7. Ausblick

T-Zellen die unter lymphopenen Bedingungen akut homöostatisch proliferieren, können die periphere Selbsttoleranz brechen, ein Potential, welches bereits im Rahmen von Immuntherapien ausgenutzt wird. Allerdings ist die Induktion einer Lymphopenie vor einem adoptiven T-Zelltransfer stets auch mit der Gefahr von Autoimmunreaktionen verknüpft. Daher stellt sich nun die Frage, ob aHP T-Zellen nicht auch *in vitro* generiert und bezüglich ihrer TCR Reaktivität modifiziert werden können.

Für die Programmierung naiver T-Zellen in Richtung aHP Phänotyp unter *in vitro* Bedingungen werden wir verschiedene Zytokinkombinationen testen. *In vivo* gelang bereits eine Programmierung von transgenen naiven T-Zellen zu voll funktionsfähigen TCM T-Zellen durch eine Behandlung mit IL-2-anti-IL-2 Komplexen (Kamimura and Bevan, 2007).

Ein derartiges *in vitro* System zur Generierung artifizieller aHP T-Zellen würde zugleich eine genetische Modifizierung der T-Zellen durch z.B siRNA oder den Einbau künstlicher T-Zellrezeptoren ermöglichen, ohne dabei auf etablierte, polyklonale Stimulationsmethoden via anti-CD3/ anti-CD28 zurückgreifen zu müssen, welche die modifizierten T-Zellen zu ausdifferenzierten Effektorzellen werden lassen, die dann *in vivo* keine gute Tumorkontrolle mehr leisten können. Vielmehr sollen in diesem *in vitro* System tumorspezifische T-Zellen mit dem beschriebenen aHP Phänotyp generiert werden, welche anschließend unter *in vivo* Bedingungen einen starken anti-Tumoreffekt induzieren können.

V. Zusammenfassung

Nach Transfer peripherer T-Zellen in einen lymphopenen Empfänger proliferieren diese T-Zellen homöostatisch. Die Homöostatische Proliferation (HP) von T-Zellen wird mit der Induktion von Autoimmunphänomenen in Verbindung gebracht, da HP T-Zellen die Selbsttoleranz des Immunsystems brechen können. Diese Eigenschaft könnte gezielt zur Verbesserung von Adoptiven Zelltherapien (ACT) bei Malignomen eingesetzt werden. Allerdings ist bis dato eine eindeutige phänotypische und funktionelle Charakterisierung der murinen HP T-Zellen nicht gelungen.

In meiner Dissertation konnte ich darstellen, dass polyklonale T-Zellen nach Transfer in die Lymphopenie eine schnelle Burst-like Proliferation (BLP), sowie eine langsame (akute) homöostatische Proliferation (a)HP zeigen, wohingegen monoklonale T-Zellen nur akut homöostatisch proliferieren. Beide proliferativen Immunantworten finden dabei sowohl unter chronisch- als auch akut-lymphopenen Bedingungen statt.

Unter Verwendung eines Transfercolitis- und eines Tumormodells konnte ich zeigen, dass die Autoimmunphänomene wie z.B. die Fähigkeit zur Colitisinduktion bzw. die Fähigkeit zur verbesserten Tumorstillung, durch die aHP vermittelt werden.

Der aHP Phänotyp trägt Kennzeichen des naiven sowie des antigenstimulierten Aktivierungszustandes einer T-Zelle. Diese Mischung grenzt die aHP T-Zellen deutlich von antigenerfahrenen T-Zellpopulationen ab, lässt sie gleichzeitig jedoch als aktivierte T-Zellen erscheinen. Als Ort der aHP von naiven CD8⁺ T-Zellen wurden erstmals eindeutig die peripheren Lymphknoten identifiziert.

Ein spezifischer Marker, der ausschließlich auf der aHP T-Zellpopulation exprimiert wird, konnte auch in dieser Arbeit nicht identifiziert werden, allerdings gelang eine Erweiterung des charakteristischen Expressionsmusters von Oberflächenmarkern der aHP T-Zelle. Im Rahmen dieser Arbeit konnte außerdem erstmals die funktionelle Relevanz der beiden Moleküle CD62L und PD-1 für die aHP von naiven CD8⁺ T-Zellen dargestellt werden.

Im Einklang mit anderen Gruppen war zu beobachten, dass der HP Phänotyp über mehrere Wochen stabil erhalten bleibt. Zudem können die funktionellen Eigenschaften der HP T-Zellen nach einmaliger Induktion unter Lymphopenie auch in nicht-lymphopene Empfängertiere transferiert werden.

Als ein möglicher Mechanismus zur Entkopplung von der Lymphopenie wurde die Unabhängigkeit der HP T-Zellen von der Co-Stimulation durch CD28 nachgewiesen. aHP T-Zellen bleiben jedoch weiterhin durch regulatorische T-Zellen supprimierbar, was klinische Relevanz bei inflammatorischen Darmerkrankungen erlangt.

Klinische Relevanz hat die aHP zudem für adoptive T-Zelltherapien bei Malignomen. Hier konnte ich in einem Tumormodell zeigen, dass aHP T-Zellen nicht nur das Tumorstadium unter lymphopenen Bedingungen besser kontrollieren, sondern auch, dass dieser funktionelle Effekt nach Induktion in eine nicht-lymphopene Umgebung transferiert werden kann. Dies würde eine Behandlung des Malignompatienten ohne Myoablation ermöglichen.

VI. Anhang

1. Der „Zweite Rezeptor“ für PDL-1 und PDL-2: Ein Nebenprojekt

Neben der Bearbeitung des Hauptprojektes zur „Phänotypischen und funktionellen Charakterisierung homöostatisch proliferierender T-Zellen im Mausmodell“ wurde zusätzlich ein Nebenprojekt bearbeitet. Dabei sollte ein hypothetischer zweiter Rezeptor für PDL-1 bzw. PDL-2 mittels eines zu etablierenden Pull-down Assays identifiziert werden. Dieses Projekt wurde bewusst als Erweiterung des Methodenspektrums dieser Dissertation ausgewählt.

In der Literatur wird immer wieder ein weiterer Rezeptor für die beiden Liganden von PD-1 postuliert, über welchen co-stimulatorische (Kanai et al., 2003; Wang et al., 2003) statt co-inhibitorische (Brown et al., 2003; Freeman et al., 2000) Signale übermittelt werden können. Wang konnte zeigen, dass PDL-1 bzw. PDL-2 in mutierter Form zwar nicht mehr an PD-1 binden kann, aber dennoch eine co-stimulatorische Wirkung besitzt. Die co-stimulatorischen Signale dieser Liganden sollen über einen bislang nicht identifizierten „Zweiten Rezeptor“ übertragen werden (Wang et al., 2003).

Wir entwickelten daher in unserem Labor einen sog. Pull-down Assay, eine abgewandelte Form der Immunpräzipitation. Bei einer Immunpräzipitation wird ein Antikörper gegen das zu isolierende Protein, in diesem Fall der anti-PD-1-Antikörper, an einer Säule fixiert, beim Pull-down Assay dagegen ein Fusionsprotein, hier die sog. „Rekombinante Maus B7-H1/Fc Chimäre“. Dieses Molekül besteht aus dem murinen PDL-1 Molekül, welches an den Fc-Teil eines humanen IgG gebunden ist. An das murine PDL-1 sollten nun theoretisch sowohl der PD-1-Rezeptor als auch der hypothetische „zweite Rezeptor“ binden können. Der anti-PD-1-Antikörper sollte dagegen nur den PD-1-Rezeptor binden können. Aus Zell-Lysaten von 2C T-Zellen wollten wir sowohl den bekannten PD-1-Rezeptor isolieren, und zwar sowohl mit der Immunpräzipitation als auch im Pull-down Assay. Zudem sollte der „zweite“, unbekannte Rezeptor im Pull-down Assay detektierbar sein. Im Zell-Lysat von 2C PD1^{-/-} T-Zellen sollte dagegen per Pull-down Assay nur der „zweite“ Rezeptor isolierbar sein, da ja die genetische Information für PD-1 fehlt. In der Immunpräzipitation wird für die 2C PD1^{-/-} T-Zellen kein Ergebnis erwartet.

In Anlehnung an Agata (Agata et al., 1996) und wie im Methodenteil beschrieben, erfolgte für die Immunopräzipitation zunächst die Kopplung des anti-PD-1-Antikörpers bzw. des Fusionsproteins an Säulen, auf welche dann die biotinylierten Zelllysate aufgetragen wurden. Der postulierte „Zweite Rezeptor“ und/oder PD-1 sollten an die Säulen binden, und von dort nach einigen Waschschritten über mehrere Elutionsschritte wieder abgelöst werden. Die gewonnen Eluate wurden anschließend über eine SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. An die biotinylierten Proteine konnte die Streptavidin-gekoppelte Peroxidase binden, welche schließlich mit Hilfe des ECL-Kits detektiert wurde.

Für die Etablierung verwendeten wir anstelle der geplanten 2C und 2C PD1^{-/-} T-Zellen EL4-Tumorzellen, da diese Lymphomzellen PD-1 konstant exprimieren, und nicht wie T-Zellen einer ständigen Regulation dieses Rezeptors unterworfen sind. Wir konnten im EL4 Zelllysat eine Bande detektieren, welche vom Molekulargewicht zu den beschriebenen 55 kDa des PD-1-Rezeptors passt. Eine weitere kleinere Bande mit ca. 22 kDa konnte zudem beobachtet werden. Allerdings dürfte es sich dabei wohl um ein Abbauprodukt handeln, da es sehr unwahrscheinlich ist, dass ein für PD-1 spezifischer Antikörper auch gleichzeitig einen hypothetischen zweiten Rezeptor erkennt. Für eine Sequenzierung waren die Proteinmengen zu gering (Abb. 25A).

Auch in einem Pull-down Experiment gelang eine Bindung des potentiellen 55kDa großen PD-1-Proteins an die Chimäre. Dieses Ergebnis konnte jedoch nicht reproduziert werden. Eine zweite Bande, und somit der postulierte „Zweite Rezeptor“, konnte allerdings mit Hilfe dieses Pull-down Assays in den EL-4 Zell-Lysaten nicht identifiziert werden (Abb. 25B). Unklar bleibt, inwieweit das T-Zell-Lymphom EL-4 noch einer normalen T-Zelle entspricht. Vielleicht haben diese Tumorzellen die genetische Information für diesen Rezeptor verloren und exprimieren den vermuteten „zweiten Rezeptor“ überhaupt nicht mehr. Eine weitere Möglichkeit wäre zudem, dass die Bindung zwischen Fusionsprotein und hypothetischem Rezeptor so schwach ausgeprägt ist, dass diese nicht ausreicht, um das gewünschte Protein fest an die Säule zu binden.

Die ursprünglich geplanten Versuche mit Zell-Lysaten von 2C im Vergleich zu 2C PD1^{-/-} T-Zellen führten nicht einmal zu Detektion des PD-1-Rezeptors, weder mit der Immunpräzipitation noch mit Hilfe des Pull-down Assays. Vermutlich können aus T-Zell-Lysaten nicht ausreichend große Mengen an PD-1 gewonnen werden, da dieser Rezeptor einer ständigen Regulation unterliegt und zu keinem Zeitpunkt eine starke Expression auf der Zelloberfläche zeigt. Auch in der Literatur ist bislang lediglich die Identifizierung von

PD-1 aus Tumorzelllinien beschrieben, welche zuvor mit der cDNA für PD-1 behandelt wurden (Agata et al., 1996).

Eine weitere Erklärung wäre die in der Literatur beschriebene Möglichkeit, dass dieser zweite Rezeptor gar nicht existiert, und sowohl co-inhibitorische als auch co-stimulatorische Signale durch PD-1 übertragen werden können. Denn PD-1 trägt in seiner zytoplasmatischen Domäne ein ITSM-Motiv, welches je nach An- oder Abwesenheit eines Adaptermoleküls sowohl negative als auch positive Signale vermitteln kann (Blank and Mackensen, 2007; Chemnitz et al., 2004).

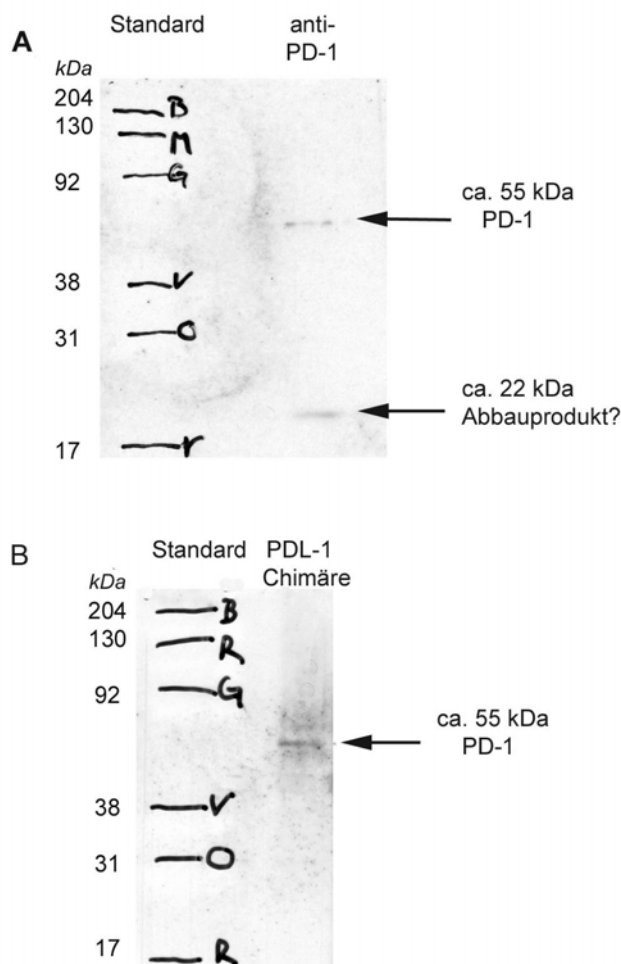


Abbildung 25: Detektion des PD-1-Proteins im Zell-Lysat von EL4-Tumorzellen mittels Immunpräzipitation bzw. Pull-down Assay

Wie im Methodenteil beschrieben, wurden EL4 Tumorzellen biotinyliert und lysiert. Dieses Lysat wurde auf Säulen aufgetragen, an welche zuvor entweder (A) der anti-PD-1-Antikörper bzw. (B) die PDL-1 Chimäre gekoppelt wurde.

An die Säule gebundene, biotinylierte Proteine wurden eluiert und in einer SDS-PAGE aufgetrennt.

Im anschließenden Western Blot wurden biotinylierte Proteine mittels einer Peroxidase, welche über Streptavidin an Biotin binden kann, im ECL-Verfahren detektiert.

Der Protein Kaleidoscope Standard (Bio-Rad) ermöglicht eine ungefähre Bestimmung der Proteingröße.

2. Material und Geräte

2.1 Verbrauchsmaterial

Pipetten, Zellkulturflaschen und Zellkulturplatten wurden über CorningCostar bezogen, soweit nicht anders angegeben.

2.2 Geräte

Sterilbank LaminaAir HB2448 (Heraeus)

Brutschrank Heraeus 6000 (Heraeus)

Zentrifuge Megafuge 3.0R (Heraeus)

Kühlzentrifuge: Biofuge fresco (Heraeus)

FACS : FACScalibur (BD Pharmingen)

Sorter : FACSaria (BD Pharmingen)

Mikroskop : Axioskop 2 Plus, (Zeiss)

3. Puffer und Lösungen

Einfriermedium für Tumorzelllinien	
FCS (hitzeinaktiviert)	50% (v/v)
Zellkulturmedium	40% (v/v)
DMSO (Sigma-Aldrich)	10% (v/v)

Zellkulturmedium für murine Zellen	
D-MEM (Gibco)	500ml
FCS (inaktiviert, PAA)	50ml
2'-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich)	1ml (von 50ml PBS + 84µl 2'-Mercaptoethanol)
MOPS-Puffer (1 molar, pH 7,2, Fluka)	5ml
Yellow Mix mit L-Arginin, Folsäure, L-Asparagin (Sigma Aldrich)	5 ml (von 1l PBS mit 11,6 g L-Arginin. 0,6g Folsäure 3,6g L-Asparagin)
Pen/Strep (Gibco)	5 ml (10.000U/ml)
Glutamin (Biochrom AG)	5 ml

PBS (Dulbecco's PBS, without Ca^{2+} and Mg^{2+} , PAA)

FCS (hitzeinaktiviert 56°C, 30 Minuten) (PAA)

DMSO (Dimethyl Sulphoxid, Sigma-Aldrich)

Ficoll (Pancoll human, PAN Biotec)

Aufreinigungspuffer Dynal	D-MEM + 10% FCS und PBS + 0,1% BSA
Aufreinigungspuffer SpinSep	D-MEM + 2% FCS
FACS-Puffer	PBS + 2% FCS + 0,02% Natriumazid (NaN_3 , Merck)
Saponin-Puffer	PBS + 0,1% Saponin (Fluka) + 0,1% BSA

ACK-Lysepuffer	
Ammoniumchlorid NH_4Cl (Merck)	8,23 g
Kaliumhydrogencarbonat KHCO_3 (Fluka)	1,0g
Na_2EDTA (Titriplex) (Merck)	100 ml
$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$	ad 1000 ml, pH 7,2

ELISA	
Coating-Puffer	0,1M NaHCO_3 (Merck)
ELISA-Waschpuffer	PBS + 0,05% TritonX-100 (Sigma-Aldrich)
TMB-Puffer	0,5M Na_2HPO_4 (Merck), 0,5M Zitronensäure (Merck) in H_2O dest., pH 5,0
TMB-Substratlösung	TMB-Tablette (3,3',5,5'-Tetramethyl-benzidine dihydrochloride, Sigma-Aldrich) lösen in 12ml TMB-Puffer + 10 μl H_2O_2 (30%ig)

Formaldehyd 37%, solution in water (Sigma-Aldrich)

Lysepuffer für Immunpräzipitation	
TrisHCl (Merck)	50 mM (pH 7,4)
NaCl (Merck)	50 mM
NP-40 (Merck)	1%
NaN_3 (Merck)	0,1%

Die Proteinaseinhibitoren Aprotinin (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Sigma-Aldrich) und PMSF (1mM, Fluka) werden jeweils frisch zugesetzt.

5 x Elektrophoresepuffer	
Tris (Merck)	15g
Glycin (Merck)	72,5 g
SDS (Sigma-Aldrich)	10g
H ₂ O _{bidest}	ad 1000 ml

Der pH-Wert wurde nicht verändert.

Acrylamid/bis-Acrylamide (Sigma-Aldrich)

Ammonium Persulfat (Sigma-Aldrich)

TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylene-diamine, Sigma-Aldrich)

Transferpuffer (Towbin-Puffer)	
Glycin p.a. (Merck)	7,21 g
Tris p.a. (Merck)	1,52g
Methanol p.a. (Merck)	100 ml
H ₂ O _{bidest}	ad 500 ml

Der pH-Wert von 8,3 musste nicht eingestellt werden.

1 x TBS-Puffer	
Tris (Merck)	3,03 g
NaCl (Merck)	8,00 g
KCl (Merck)	0,20 g
H ₂ O _{bidest}	ad 1000 ml

Der pH-Wert wurde mit HCl konz. auf 7,4 eingestellt.

TBS-Tween 20

1 x TBS-Puffer mit 0,1% (v/v) Tween 20 (Dako Cytomation)

4. Anbieterverzeichnis

Abott	Wiesbaden
Amersham Biosciences	Buckinghamshire, UK
BD Pharmingen	Heidelberg / San Diego, CA
Bio-Rad	München
Biochrom AG	Berlin
Biometra	Göttingen
CellSystems	St. Katharinen
Corning Costar	New York, USA
DakoCytomation	Glostrup, Dänemark
Dianova	Hamburg
Ebioscience	San Diego, CA
Engelbrecht Medizin- und Labortechnik	Edermünde
Fluka	Seelze
Gibco, Invitrogen	Karlsruhe
Greiner	Frickenhäusen
Hartmann Analytic	Braunschweig
Heraeus	Hanau
Invitrogen	Karlsruhe
Invitrogen Dynal	Oslo, Norwegen
Leica	Wetzlar
Medac	Hamburg
Menzel	Braunschweig
Merck	Darmstadt
Millipore	Bedford, USA
Miltenyi Biotech	Bergisch-Gladbach
Minerva Biolabs	Berlin
Molecular Probes	Eugene, Oregon
PAA	Linz, Österreich
PAN Biotech	Aidenbach
Perkin Elmer Life Sciences	Boston, USA
Pierce	Rockford, USA
PromoKine	Heidelberg
R&D Systems	Minneapolis, USA
Roth	Karlsruhe
Sakura DiaTek	Hallstadt
Sigma-Aldrich	Steinheim
Zeiss	Jena

VII. Abkürzungsverzeichnis

ACT	adoptive Zelltherapie
Ag	Antigen
AICD	activation induced cell death
APC	Allophycocyanin
APC	antigenpräsentierende Zelle
ATCC	American type culture collection
(a)HP	(acute) Homöostatische Proliferation
BLP	Burst-like Proliferation
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD	cluster of differentiation
CCR 7	Chemokinrezeptor 7
CFSE	Carboxyfluorescein-Diazetat-Succinimidly-Ester
DC	dendritische Zelle
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
FACS	fluorescence activated cell sorting
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein-iodthiocyanat
FRC	fibroblastic reticular cells
Gy	Gray
HEV	high endothelial venules
IFN- γ	Interferon gamma
IL-7	Interleukin 7
IL-7R	Interleukin-7 Rezeptor
i.v.	intravenös
LIP	Lymphopenie-induzierte Proliferation
MAK	monoklonaler Antikörper
MLN	mesenteriale Lymphknoten
MTOC	microtubuli-organizing center
NHP T-Zellen	Nicht homöostatische proliferierende T-Zellen
PBS	Phosphate buffered saline
PD-1	Programmed-death – 1
PDL-1	Programmed-death Ligand – 1
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridin-Chlorophyll-Protein
PI	Propidiumjodid
RAG	recombination-activating gene
s.c.	subkutan
SDS-PAGE	Sodium-dodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese
SLO	sekundäre Lymphorgane
TAA	tumorassoziertes Antigen
TCR	T-Zellrezeptor
Treg	regulatorische T-Zellen
U	units
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

VIII. Literaturverzeichnis

Abad, J.D., Wrzensinski, C., Overwijk, W., De Witte, M.A., Jorritsma, A., Hsu, C., Gattinoni, L., Cohen, C.J., Paulos, C.M., Palmer, D.C., *et al.* (2008). T-cell receptor gene therapy of established tumors in a murine melanoma model. *J Immunother* 31, 1-6.

Agata, Y., Kawasaki, A., Nishimura, H., Ishida, Y., Tsubata, T., Yagita, H., and Honjo, T. (1996). Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *International immunology* 8, 765-772.

Alimzhanov, M.B., Kuprash, D.V., Kosco-Vilbois, M.H., Luz, A., Turetskaya, R.L., Tarakhovsky, A., Rajewsky, K., Nedospasov, S.A., and Pfeffer, K. (1997). Abnormal development of secondary lymphoid tissues in lymphotoxin beta-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 9302-9307.

Anderson, M.S., Venzani, E.S., Chen, Z., Berzins, S.P., Benoist, C., and Mathis, D. (2005). The cellular mechanism of Aire control of T cell tolerance. *Immunity* 23, 227-239.

Arbones, M.L., Ord, D.C., Ley, K., Ratech, H., Maynard-Curry, C., Otten, G., Capon, D.J., and Tedder, T.F. (1994). Lymphocyte homing and leukocyte rolling and migration are impaired in L-selectin-deficient mice. *Immunity* 1, 247-260.

Avni, O., Lee, D., Macian, F., Szabo, S.J., Glimcher, L.H., and Rao, A. (2002). T(H) cell differentiation is accompanied by dynamic changes in histone acetylation of cytokine genes. *Nature immunology* 3, 643-651.

Azzam, H.S., DeJarnette, J.B., Huang, K., Emmons, R., Park, C.S., Sommers, C.L., El-Khoury, D., Shores, E.W., and Love, P.E. (2001). Fine tuning of TCR signaling by CD5. *J Immunol* 166, 5464-5472.

Banks, T.A., Rouse, B.T., Kerley, M.K., Blair, P.J., Godfrey, V.L., Kuklin, N.A., Bouley, D.M., Thomas, J., Kanangat, S., and Mucenski, M.L. (1995). Lymphotoxin-alpha-deficient mice. Effects on secondary lymphoid organ development and humoral immune responsiveness. *J Immunol* 155, 1685-1693.

Barber, D.L., Wherry, E.J., Masopust, D., Zhu, B., Allison, J.P., Sharpe, A.H., Freeman, G.J., and Ahmed, R. (2006). Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* 439, 682-687.

Barthlott, T., Kassiotis, G., and Stockinger, B. (2003). T cell regulation as a side effect of homeostasis and competition. *The Journal of experimental medicine* 197, 451-460.

Becker, T.C., Coley, S.M., Wherry, E.J., and Ahmed, R. (2005). Bone marrow is a preferred site for homeostatic proliferation of memory CD8 T cells. *J Immunol* 174, 1269-1273.

Bell, E.B., Sparshott, S.M., Drayson, M.T., and Ford, W.L. (1987). The stable and permanent expansion of functional T lymphocytes in athymic nude rats after a single injection of mature T cells. *J Immunol* 139, 1379-1384.

Berard, M., Brandt, K., Bulfone-Paus, S., and Tough, D.F. (2003). IL-15 promotes the survival of naive and memory phenotype CD8+ T cells. *J Immunol* 170, 5018-5026.

- Blank, C., Brown, I., Marks, R., Nishimura, H., Honjo, T., and Gajewski, T.F. (2003). Absence of programmed death receptor 1 alters thymic development and enhances generation of CD4/CD8 double-negative TCR-transgenic T cells. *J Immunol* 171, 4574-4581.
- Blank, C., Brown, I., Peterson, A.C., Spiotto, M., Iwai, Y., Honjo, T., and Gajewski, T.F. (2004). PD-L1/B7H-1 inhibits the effector phase of tumor rejection by T cell receptor (TCR) transgenic CD8⁺ T cells. *Cancer research* 64, 1140-1145.
- Blank, C., and Mackensen, A. (2007). Contribution of the PD-L1/PD-1 pathway to T-cell exhaustion: an update on implications for chronic infections and tumor evasion. *Cancer Immunol Immunother* 56, 739-745.
- Bourgeois, C., and Stockinger, B. (2006). T cell homeostasis in steady state and lymphopenic conditions. *Immunology letters* 107, 89-92.
- Boyman, O., Purton, J.F., Surh, C.D., and Sprent, J. (2007). Cytokines and T-cell homeostasis. *Current opinion in immunology* 19, 320-326.
- Bracci, L., Moschella, F., Sestili, P., La Sorsa, V., Valentini, M., Canini, I., Baccarini, S., Maccari, S., Ramoni, C., Belardelli, F., *et al.* (2007). Cyclophosphamide Enhances the Antitumor Efficacy of Adoptively Transferred Immune Cells through the Induction of Cytokine Expression, B-Cell and T-Cell Homeostatic Proliferation, and Specific Tumor Infiltration. *Clin Cancer Res* 13, 644-653.
- Brown, I.E., Blank, C., Kline, J., Kacha, A.K., and Gajewski, T.F. (2006). Homeostatic proliferation as an isolated variable reverses CD8⁺ T cell anergy and promotes tumor rejection. *J Immunol* 177, 4521-4529.
- Brown, J.A., Dorfman, D.M., Ma, F.R., Sullivan, E.L., Munoz, O., Wood, C.R., Greenfield, E.A., and Freeman, G.J. (2003). Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production. *J Immunol* 170, 1257-1266.
- Cannon, W. (1932). *The Wisdom of the Body* (New York, Norton).
- Chao, C.C., Jensen, R., and Dailey, M.O. (1997). Mechanisms of L-selectin regulation by activated T cells. *J Immunol* 159, 1686-1694.
- Chemnitz, J.M., Parry, R.V., Nichols, K.E., June, C.H., and Riley, J.L. (2004). SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation. *J Immunol* 173, 945-954.
- Chen, J., Eisen, H.N., and Kranz, D.M. (2003). A model T-cell receptor system for studying memory T-cell development. *Microbes Infect* 5, 233-240.
- Cho, B.K., Rao, V.P., Ge, Q., Eisen, H.N., and Chen, J. (2000). Homeostasis-stimulated proliferation drives naive T cells to differentiate directly into memory T cells. *The Journal of experimental medicine* 192, 549-556.
- Cho, J.H., Boyman, O., Kim, H.O., Hahm, B., Rubinstein, M.P., Ramsey, C., Kim, D.M., Surh, C.D., and Sprent, J. (2007). An intense form of homeostatic proliferation of naive CD8⁺ cells driven by IL-2. *The Journal of experimental medicine* 204, 1787-1801.
- Dai, Z., and Lakkis, F.G. (2001). Cutting edge: Secondary lymphoid organs are essential for maintaining the CD4, but not CD8, naive T cell pool. *J Immunol* 167, 6711-6715.

Day, C.L., Kaufmann, D.E., Kiepiela, P., Brown, J.A., Moodley, E.S., Reddy, S., Mackey, E.W., Miller, J.D., Leslie, A.J., DePierres, C., *et al.* (2006). PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature* 443, 350-354.

Dudley, M.E., and Rosenberg, S.A. (2007). Adoptive cell transfer therapy. *Seminars in oncology* 34, 524-531.

Dudley, M.E., Wunderlich, J.R., Yang, J.C., Sherry, R.M., Topalian, S.L., Restifo, N.P., Royal, R.E., Kammula, U., White, D.E., Mavroukakis, S.A., *et al.* (2005). Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 23, 2346-2357.

Dummer, W., Ernst, B., LeRoy, E., Lee, D., and Surh, C. (2001). Autologous regulation of naive T cell homeostasis within the T cell compartment. *J Immunol* 166, 2460-2468.

Dummer, W., Niethammer, A.G., Baccala, R., Lawson, B.R., Wagner, N., Reisfeld, R.A., and Theofilopoulos, A.N. (2002). T cell homeostatic proliferation elicits effective antitumor autoimmunity. *The Journal of clinical investigation* 110, 185-192.

Dunn, G.P., Bruce, A.T., Ikeda, H., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature immunology* 3, 991-998.

Elson, C.O., Cong, Y., McCracken, V.J., Dimmitt, R.A., Lorenz, R.G., and Weaver, C.T. (2005). Experimental models of inflammatory bowel disease reveal innate, adaptive, and regulatory mechanisms of host dialogue with the microbiota. *Immunological reviews* 206, 260-276.

Ernst, B., Lee, D.S., Chang, J.M., Sprent, J., and Surh, C.D. (1999). The peptide ligands mediating positive selection in the thymus control T cell survival and homeostatic proliferation in the periphery. *Immunity* 11, 173-181.

Fischer, K., Voelkl, S., Berger, J., Andreesen, R., Pomorski, T., and Mackensen, A. (2006). Antigen recognition induces phosphatidylserine exposure on the cell surface of human CD8+ T cells. *Blood* 108, 4094-4101.

Fortner, K.A., and Budd, R.C. (2005). The death receptor Fas (CD95/APO-1) mediates the deletion of T lymphocytes undergoing homeostatic proliferation. *J Immunol* 175, 4374-4382.

Freeman, G.J., Long, A.J., Iwai, Y., Bourque, K., Chernova, T., Nishimura, H., Fitz, L.J., Malenkovich, N., Okazaki, T., Byrne, M.C., *et al.* (2000). Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *The Journal of experimental medicine* 192, 1027-1034.

Fry, T.J., and Mackall, C.L. (2001). Interleukin-7: master regulator of peripheral T-cell homeostasis? *Trends in immunology* 22, 564-571.

Fung-Leung, W.P., Surh, C.D., Liljedahl, M., Pang, J., Leturcq, D., Peterson, P.A., Webb, S.R., and Karlsson, L. (1996). Antigen presentation and T cell development in H2-M-deficient mice. *Science (New York, NY)* 271, 1278-1281.

Gajewski, T.F. (1996). B7-1 but not B7-2 efficiently costimulates CD8+ T lymphocytes in the P815 tumor system in vitro. *J Immunol* 156, 465-472.

Gattinoni, L., Klebanoff, C.A., Palmer, D.C., Wrzesinski, C., Kerstann, K., Yu, Z., Finkelstein, S.E., Theoret, M.R., Rosenberg, S.A., and Restifo, N.P. (2005). Acquisition of full effector function in vitro paradoxically impairs the in vivo antitumor efficacy of adoptively transferred CD8⁺ T cells. *The Journal of clinical investigation* 115, 1616-1626.

Gattinoni, L., Powell, D.J., Jr., Rosenberg, S.A., and Restifo, N.P. (2006). Adoptive immunotherapy for cancer: building on success. *Nature reviews* 6, 383-393.

Ge, Q., Bai, A., Jones, B., Eisen, H.N., and Chen, J. (2004). Competition for self-peptide-MHC complexes and cytokines between naive and memory CD8⁺ T cells expressing the same or different T cell receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 3041-3046.

Ge, Q., Hu, H., Eisen, H.N., and Chen, J. (2002). Different contributions of thymopoiesis and homeostasis-driven proliferation to the reconstitution of naive and memory T cell compartments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 2989-2994.

Ge, Q., Rao, V.P., Cho, B.K., Eisen, H.N., and Chen, J. (2001). Dependence of lymphopenia-induced T cell proliferation on the abundance of peptide/ MHC epitopes and strength of their interaction with T cell receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 1728-1733.

Goldrath, A.W., and Bevan, M.J. (1999a). Low-affinity ligands for the TCR drive proliferation of mature CD8⁺ T cells in lymphopenic hosts. *Immunity* 11, 183-190.

Goldrath, A.W., and Bevan, M.J. (1999b). Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire. *Nature* 402, 255-262.

Goldrath, A.W., Bogatzki, L.Y., and Bevan, M.J. (2000). Naive T cells transiently acquire a memory-like phenotype during homeostasis-driven proliferation. *The Journal of experimental medicine* 192, 557-564.

Goldrath, A.W., Luckey, C.J., Park, R., Benoist, C., and Mathis, D. (2004). The molecular program induced in T cells undergoing homeostatic proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 16885-16890.

Goldrath, A.W., Sivakumar, P.V., Glaccum, M., Kennedy, M.K., Bevan, M.J., Benoist, C., Mathis, D., and Butz, E.A. (2002). Cytokine requirements for acute and Basal homeostatic proliferation of naive and memory CD8⁺ T cells. *The Journal of experimental medicine* 195, 1515-1522.

Greenwald, R.J., Freeman, G.J., and Sharpe, A.H. (2005). The B7 family revisited. *Annual review of immunology* 23, 515-548.

Guarda, G., Hons, M., Soriano, S.F., Huang, A.Y., Polley, R., Martin-Fontecha, A., Stein, J.V., Germain, R.N., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2007). L-selectin-negative CCR7⁻ effector and memory CD8⁺ T cells enter reactive lymph nodes and kill dendritic cells. *Nature immunology* 8, 743-752.

Gudmundsdottir, H., and Turka, L.A. (2001). A closer look at homeostatic proliferation of CD4⁺ T cells: costimulatory requirements and role in memory formation. *J Immunol* 167, 3699-3707.

Hall, J.G., and Morris, B. (1965). The Origin of the Cells in the Efferent Lymph from a Single Lymph Node. *The Journal of experimental medicine* 121, 901-910.

Hamilton, S.E., Wolkers, M.C., Schoenberger, S.P., and Jameson, S.C. (2006). The generation of protective memory-like CD8⁺ T cells during homeostatic proliferation requires CD4⁺ T cells. *Nature immunology* 7, 475-481.

Hanninen, A., Jaakkola, I., Salmi, M., Simell, O., and Jalkanen, S. (1997). Ly-6C regulates endothelial adhesion and homing of CD8(+) T cells by activating integrin-dependent adhesion pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 6898-6903.

Hehlgans, T., Stoelcker, B., Stopfer, P., Muller, P., Cernaianu, G., Guba, M., Steinbauer, M., Nedospasov, S.A., Pfeffer, K., and Mannel, D.N. (2002). Lymphotoxin-beta receptor immune interaction promotes tumor growth by inducing angiogenesis. *Cancer research* 62, 4034-4040.

Hellstrom, K.E., Hellstrom, I., Kant, J.A., and Tamerius, J.D. (1978). Regression and inhibition of sarcoma growth by interference with a radiosensitive T-cell population. *The Journal of experimental medicine* 148, 799-804.

Hinrichs, C.S., Gattinoni, L., and Restifo, N.P. (2006). Programming CD8⁺ T cells for effective immunotherapy. *Current opinion in immunology* 18, 363-370.

Hoffmann, P., Ermann, J., Edinger, M., Fathman, C.G., and Strober, S. (2002). Donor-type CD4(+)CD25(+) regulatory T cells suppress lethal acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *The Journal of experimental medicine* 196, 389-399.

Hu, H.M., Poehlein, C.H., Urba, W.J., and Fox, B.A. (2002). Development of antitumor immune responses in reconstituted lymphopenic hosts. *Cancer research* 62, 3914-3919.

Ichii, H., Sakamoto, A., Hatano, M., Okada, S., Toyama, H., Taki, S., Arima, M., Kuroda, Y., and Tokuhisa, T. (2002). Role for Bcl-6 in the generation and maintenance of memory CD8⁺ T cells. *Nature immunology* 3, 558-563.

Ishida, Y., Agata, Y., Shibahara, K., and Honjo, T. (1992). Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *Embo J* 11, 3887-3895.

Iwai, Y., Ishida, M., Tanaka, Y., Okazaki, T., Honjo, T., and Minato, N. (2002). Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 12293-12297.

Izcue, A., Coombes, J.L., and Powrie, F. (2006). Regulatory T cells suppress systemic and mucosal immune activation to control intestinal inflammation. *Immunological reviews* 212, 256-271.

Jaakkola, I., Merinen, M., Jalkanen, S., and Hanninen, A. (2003). Ly6C induces clustering of LFA-1 (CD11a/CD18) and is involved in subtype-specific adhesion of CD8 T cells. *J Immunol* 170, 1283-1290.

Jameson, S.C. (2002). Maintaining the norm: T-cell homeostasis. *Nature reviews* 2, 547-556.

Johansson, M., Arlestig, L., Moller, B., and Rantapaa-Dahlqvist, S. (2005). Association of a PDCD1 polymorphism with renal manifestations in systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism* 52, 1665-1669.

Kamimura, D., and Bevan, M.J. (2007). Naive CD8⁺ T cells differentiate into protective memory-like cells after IL-2 anti IL-2 complex treatment in vivo. *The Journal of experimental medicine* 204, 1803-1812.

Kanai, T., Totsuka, T., Uraushihara, K., Makita, S., Nakamura, T., Koganei, K., Fukushima, T., Akiba, H., Yagita, H., Okumura, K., *et al.* (2003). Blockade of B7-H1 suppresses the development of chronic intestinal inflammation. *J Immunol* 171, 4156-4163.

Kassiotis, G., Zamoyska, R., and Stockinger, B. (2003). Involvement of avidity for major histocompatibility complex in homeostasis of naive and memory T cells. *The Journal of experimental medicine* 197, 1007-1016.

Kedzierska, K., Stambas, J., Jenkins, M.R., Keating, R., Turner, S.J., and Doherty, P.C. (2007). Location rather than CD62L phenotype is critical in the early establishment of influenza-specific CD8⁺ T cell memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 9782-9787.

Keir, M.E., Francisco, L.M., and Sharpe, A.H. (2007). PD-1 and its ligands in T-cell immunity. *Current opinion in immunology* 19, 309-314.

Keir, M.E., Latchman, Y.E., Freeman, G.J., and Sharpe, A.H. (2005). Programmed death-1 (PD-1):PD-ligand 1 interactions inhibit TCR-mediated positive selection of thymocytes. *J Immunol* 175, 7372-7379.

Kieper, W.C., Burghardt, J.T., and Surh, C.D. (2004). A role for TCR affinity in regulating naive T cell homeostasis. *J Immunol* 172, 40-44.

Kieper, W.C., and Jameson, S.C. (1999). Homeostatic expansion and phenotypic conversion of naive T cells in response to self peptide/MHC ligands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 13306-13311.

Kieper, W.C., Prlic, M., Schmidt, C.S., Mescher, M.F., and Jameson, S.C. (2001). IL-12 enhances CD8 T cell homeostatic expansion. *J Immunol* 166, 5515-5521.

Kieper, W.C., Tan, J.T., Bondi-Boyd, B., Gapin, L., Sprent, J., Ceredig, R., and Surh, C.D. (2002). Overexpression of interleukin (IL)-7 leads to IL-15-independent generation of memory phenotype CD8⁺ T cells. *The Journal of experimental medicine* 195, 1533-1539.

Kieper, W.C., Troy, A., Burghardt, J.T., Ramsey, C., Lee, J.Y., Jiang, H.Q., Dummer, W., Shen, H., Cebra, J.J., and Surh, C.D. (2005). Recent immune status determines the source of antigens that drive homeostatic T cell expansion. *J Immunol* 174, 3158-3163.

King, C., Ilic, A., Koelsch, K., and Sarvetnick, N. (2004). Homeostatic expansion of T cells during immune insufficiency generates autoimmunity. *Cell* 117, 265-277.

Klebanoff, C.A., Gattinoni, L., and Restifo, N.P. (2006). CD8⁺ T-cell memory in tumor immunology and immunotherapy. *Immunological reviews* 211, 214-224.

Klebanoff, C.A., Khong, H.T., Antony, P.A., Palmer, D.C., and Restifo, N.P. (2005). Sinks, suppressors and antigen presenters: how lymphodepletion enhances T cell-mediated tumor immunotherapy. *Trends in immunology* 26, 111-117.

Klenerman, P., and Hill, A. (2005). T cells and viral persistence: lessons from diverse infections. *Nature immunology* 6, 873-879.

- Kodera, M., Grailer, J.J., Karalewitz, A.P., Subramanian, H., and Steeber, D.A. (2008). T Lymphocyte Migration to Lymph Nodes Is Maintained during Homeostatic Proliferation. *Microsc Microanal*, 1-14.
- Kranz, D.M., Tonegawa, S., and Eisen, H.N. (1984). Attachment of an anti-receptor antibody to non-target cells renders them susceptible to lysis by a clone of cytotoxic T lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81, 7922-7926.
- Krupica, T., Jr., Fry, T.J., and Mackall, C.L. (2006). Autoimmunity during lymphopenia: a two-hit model. *Clin Immunol* 120, 121-128.
- Latchman, Y., Wood, C.R., Chernova, T., Chaudhary, D., Borde, M., Chernova, I., Iwai, Y., Long, A.J., Brown, J.A., Nunes, R., *et al.* (2001). PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nature immunology* 2, 261-268.
- Le Campion, A., Bourgeois, C., Lambomez, F., Martin, B., Leument, S., Dautigny, N., Tanchot, C., Penit, C., and Lucas, B. (2002). Naive T cells proliferate strongly in neonatal mice in response to self-peptide/self-MHC complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 4538-4543.
- Lee, S.K., and Surh, C.D. (2005). Role of interleukin-7 in bone and T-cell homeostasis. *Immunological reviews* 208, 169-180.
- Lin, S.J., Peacock, C.D., Bahl, K., and Welsh, R.M. (2007). Programmed death-1 (PD-1) defines a transient and dysfunctional oligoclonal T cell population in acute homeostatic proliferation. *The Journal of experimental medicine* 204, 2321-2333.
- Link, A., Vogt, T.K., Favre, S., Britschgi, M.R., Acha-Orbea, H., Hinz, B., Cyster, J.G., and Luther, S.A. (2007). Fibroblastic reticular cells in lymph nodes regulate the homeostasis of naive T cells. *Nature immunology* 8, 1255-1265.
- Lyons, A.B., and Parish, C.R. (1994). Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *Journal of immunological methods* 171, 131-137.
- Mackensen, A., Meidenbauer, N., Vogl, S., Laumer, M., Berger, J., and Andreessen, R. (2006). Phase I Study of Adoptive T-Cell Therapy Using Antigen-Specific CD8+ T Cells for treatment of Patients With Metastatic Melanoma. *J Clin Oncol* 24, in press.
- Maloy, K.J., and Powrie, F. (2001). Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nature immunology* 2, 816-822.
- Maraskovsky, E., Teepe, M., Morrissey, P.J., Braddy, S., Miller, R.E., Lynch, D.H., and Peschon, J.J. (1996). Impaired survival and proliferation in IL-7 receptor-deficient peripheral T cells. *J Immunol* 157, 5315-5323.
- Margolick, J.B., and Donnenberg, A.D. (1997). T-cell homeostasis in HIV-1 infection. *Seminars in immunology* 9, 381-388.
- Marrack, P., Bender, J., Hildeman, D., Jordan, M., Mitchell, T., Murakami, M., Sakamoto, A., Schaefer, B.C., Swanson, B., and Kappler, J. (2000). Homeostasis of alpha beta TCR+ T cells. *Nature immunology* 1, 107-111.
- Martin, W.D., Hicks, G.G., Mendiratta, S.K., Leva, H.I., Ruley, H.E., and Van Kaer, L. (1996). H2-M mutant mice are defective in the peptide loading of class II molecules, antigen presentation, and T cell repertoire selection. *Cell* 84, 543-550.

Maury, S., Salomon, B., Klatzmann, D., and Cohen, J.L. (2001). Division rate and phenotypic differences discriminate alloreactive and nonalloreactive T cells transferred in lethally irradiated mice. *Blood* 98, 3156-3158.

McHugh, R.S., and Shevach, E.M. (2002). Cutting edge: depletion of CD4+CD25+ regulatory T cells is necessary, but not sufficient, for induction of organ-specific autoimmune disease. *J Immunol* 168, 5979-5983.

McMahan, R.H., and Slansky, J.E. (2007). Mobilizing the low-avidity T cell repertoire to kill tumors. *Seminars in cancer biology* 17, 317-329.

Miller, R.A., and Stutman, O. (1984). T cell repopulation from functionally restricted splenic progenitors: 10,000-fold expansion documented by using limiting dilution analyses. *J Immunol* 133, 2925-2932.

Min, B., Foucras, G., Meier-Schellersheim, M., and Paul, W.E. (2004). Spontaneous proliferation, a response of naive CD4 T cells determined by the diversity of the memory cell repertoire. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 3874-3879.

Min, B., McHugh, R., Sempowski, G.D., Mackall, C., Foucras, G., and Paul, W.E. (2003). Neonates support lymphopenia-induced proliferation. *Immunity* 18, 131-140.

Min, B., and Paul, W.E. (2005). Endogenous proliferation: burst-like CD4 T cell proliferation in lymphopenic settings. *Seminars in immunology* 17, 201-207.

Min, B., Yamane, H., Hu-Li, J., and Paul, W.E. (2005). Spontaneous and homeostatic proliferation of CD4 T cells are regulated by different mechanisms. *J Immunol* 174, 6039-6044.

Miyasaka, M., and Tanaka, T. (2004). Lymphocyte trafficking across high endothelial venules: dogmas and enigmas. *Nature reviews* 4, 360-370.

Miyazaki, T., Wolf, P., Tourne, S., Waltzinger, C., Dierich, A., Barois, N., Ploegh, H., Benoist, C., and Mathis, D. (1996). Mice lacking H2-M complexes, enigmatic elements of the MHC class II peptide-loading pathway. *Cell* 84, 531-541.

Mombaerts, P., Iacomini, J., Johnson, R.S., Herrup, K., Tonegawa, S., and Papaioannou, V.E. (1992). RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* 68, 869-877.

Moses, C.T., Thorstenson, K.M., Jameson, S.C., and Khoruts, A. (2003). Competition for self ligands restrains homeostatic proliferation of naive CD4 T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 1185-1190.

Mottet, C., Uhlig, H.H., and Powrie, F. (2003). Cutting edge: cure of colitis by CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 170, 3939-3943.

Mule, J.J., Jones, F.R., Hellstrom, I., and Hellstrom, K.E. (1979). Selective localization of radiolabeled immune lymphocytes into syngeneic tumors. *J Immunol* 123, 600-606.

Murali-Krishna, K., and Ahmed, R. (2000). Cutting edge: naive T cells masquerading as memory cells. *J Immunol* 165, 1733-1737.

Muranski, P., Boni, A., Wrzesinski, C., Citrin, D.E., Rosenberg, S.A., Childs, R., and Restifo, N.P. (2006). Increased intensity lymphodepletion and adoptive immunotherapy--how far can we go? *Nat Clin Pract Oncol* 3, 668-681.

Neujahr, D.C., Chen, C., Huang, X., Markmann, J.F., Cobbold, S., Waldmann, H., Sayegh, M.H., Hancock, W.W., and Turka, L.A. (2006). Accelerated memory cell homeostasis during T cell depletion and approaches to overcome it. *J Immunol* 176, 4632-4639.

Nielsen, C., Hansen, D., Husby, S., Jacobsen, B.B., and Lillevang, S.T. (2003). Association of a putative regulatory polymorphism in the PD-1 gene with susceptibility to type 1 diabetes. *Tissue antigens* 62, 492-497.

Nishimura, H., Minato, N., Nakano, T., and Honjo, T. (1998). Immunological studies on PD-1 deficient mice: implication of PD-1 as a negative regulator for B cell responses. *International immunology* 10, 1563-1572.

Nishimura, H., Nose, M., Hiai, H., Minato, N., and Honjo, T. (1999). Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity* 11, 141-151.

Nishimura, H., Okazaki, T., Tanaka, Y., Nakatani, K., Hara, M., Matsumori, A., Sasayama, S., Mizoguchi, A., Hiai, H., Minato, N., *et al.* (2001). Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. *Science (New York, NY)* 291, 319-322.

Oehen, S., and Brduscha-Riem, K. (1999). Naive cytotoxic T lymphocytes spontaneously acquire effector function in lymphocytopenic recipients: A pitfall for T cell memory studies? *European journal of immunology* 29, 608-614.

Okazaki, T., and Honjo, T. (2006). The PD-1-PD-L pathway in immunological tolerance. *Trends in immunology* 27, 195-201.

Okazaki, T., and Honjo, T. (2007). PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application. *International immunology* 19, 813-824.

Okazaki, T., Tanaka, Y., Nishio, R., Mitsuiye, T., Mizoguchi, A., Wang, J., Ishida, M., Hiai, H., Matsumori, A., Minato, N., *et al.* (2003). Autoantibodies against cardiac troponin I are responsible for dilated cardiomyopathy in PD-1-deficient mice. *Nature medicine* 9, 1477-1483.

Park, J.H., Yu, Q., Erman, B., Appelbaum, J.S., Montoya-Durango, D., Grimes, H.L., and Singer, A. (2004). Suppression of IL7 α transcription by IL-7 and other prosurvival cytokines: a novel mechanism for maximizing IL-7-dependent T cell survival. *Immunity* 21, 289-302.

Pellegrini, M., Bouillet, P., Robati, M., Belz, G.T., Davey, G.M., and Strasser, A. (2004). Loss of Bim increases T cell production and function in interleukin 7 receptor-deficient mice. *The Journal of experimental medicine* 200, 1189-1195.

Pettersson, F.E., and Gronvik, K.O. (2003). Long-term CD4⁺ and CD8⁺ memory T cells developed in severe combined immunodeficiency mice during homeostasis exhibit differences in sensitivity to antigen. *Scandinavian journal of immunology* 57, 311-318.

Pircher, H., Michalopoulos, E.E., Iwamoto, A., Ohashi, P.S., Baenziger, J., Hengartner, H., Zinkernagel, R.M., and Mak, T.W. (1987). Molecular analysis of the antigen receptor of virus-specific cytotoxic T cells and identification of a new V α family. *European journal of immunology* 17, 1843-1846.

Ploix, C., Lo, D., and Carson, M.J. (2001). A ligand for the chemokine receptor CCR7 can influence the homeostatic proliferation of CD4 T cells and progression of autoimmunity. *J Immunol* 167, 6724-6730.

- Powrie, F., Leach, M.W., Mauze, S., Caddle, L.B., and Coffman, R.L. (1993). Phenotypically distinct subsets of CD4⁺ T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C. B-17 scid mice. *International immunology* 5, 1461-1471.
- Prlic, M., Blazar, B.R., Khoruts, A., Zell, T., and Jameson, S.C. (2001). Homeostatic expansion occurs independently of costimulatory signals. *J Immunol* 167, 5664-5668.
- Prlic, M., and Jameson, S.C. (2002). Homeostatic expansion versus antigen-driven proliferation: common ends by different means? *Microbes Infect* 4, 531-537.
- Rocha, B., Dautigny, N., and Pereira, P. (1989). Peripheral T lymphocytes: expansion potential and homeostatic regulation of pool sizes and CD4/CD8 ratios in vivo. *European journal of immunology* 19, 905-911.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., and Toda, M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155, 1151-1164.
- Sallusto, F., Geginat, J., and Lanzavecchia, A. (2004). Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annual review of immunology* 22, 745-763.
- Sallusto, F., Lenig, D., Forster, R., Lipp, M., and Lanzavecchia, A. (1999). Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401, 708-712.
- Schluns, K.S., Kieper, W.C., Jameson, S.C., and Lefrancois, L. (2000). Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo. *Nature immunology* 1, 426-432.
- Schober, S.L., Kuo, C.T., Schluns, K.S., Lefrancois, L., Leiden, J.M., and Jameson, S.C. (1999). Expression of the transcription factor lung Kruppel-like factor is regulated by cytokines and correlates with survival of memory T cells in vitro and in vivo. *J Immunol* 163, 3662-3667.
- Sha, W.C., Nelson, C.A., Newberry, R.D., Kranz, D.M., Russell, J.H., and Loh, D.Y. (1988). Selective expression of an antigen receptor on CD8-bearing T lymphocytes in transgenic mice. *Nature* 335, 271-274.
- Shinkai, Y., Rathbun, G., Lam, K.P., Oltz, E.M., Stewart, V., Mendelsohn, M., Charron, J., Datta, M., Young, F., Stall, A.M., *et al.* (1992). RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* 68, 855-867.
- Smalley, D.M., and Ley, K. (2005). L-selectin: mechanisms and physiological significance of ectodomain cleavage. *Journal of cellular and molecular medicine* 9, 255-266.
- Smith, K., Seddon, B., Purbhoo, M.A., Zamoyska, R., Fisher, A.G., and Merckenschlager, M. (2001). Sensory adaptation in naive peripheral CD4 T cells. *The Journal of experimental medicine* 194, 1253-1261.
- Spiotto, M.T., Yu, P., Rowley, D.A., Nishimura, M.I., Meredith, S.C., Gajewski, T.F., Fu, Y.X., and Schreiber, H. (2002). Increasing tumor antigen expression overcomes "ignorance" to solid tumors via crosspresentation by bone marrow-derived stromal cells. *Immunity* 17, 737-747.
- Sprent, J., and Surh, C.D. (2003a). Cytokines and T cell homeostasis. *Immunology letters* 85, 145-149.

- Sprent, J., and Surh, C.D. (2003b). Knowing one's self: central tolerance revisited. *Nature immunology* 4, 303-304.
- Steeber, D.A., Green, N.E., Sato, S., and Tedder, T.F. (1996). Lymphocyte migration in L-selectin-deficient mice. Altered subset migration and aging of the immune system. *J Immunol* 157, 1096-1106.
- Stockinger, B., Barthlott, T., and Kassiotis, G. (2004a). The concept of space and competition in immune regulation. *Immunology* 111, 241-247.
- Stockinger, B., Kassiotis, G., and Bourgeois, C. (2004b). Homeostasis and T cell regulation. *Current opinion in immunology* 16, 775-779.
- Surh, C.D., and Sprent, J. (2000). Homeostatic T cell proliferation: how far can T cells be activated to self-ligands? *The Journal of experimental medicine* 192, F9-F14.
- Surh, C.D., and Sprent, J. (2002). Regulation of naive and memory T-cell homeostasis. *Microbes Infect* 4, 51-56.
- Tan, J.T., Dudl, E., LeRoy, E., Murray, R., Sprent, J., Weinberg, K.I., and Surh, C.D. (2001). IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naive T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 8732-8737.
- Tan, J.T., Ernst, B., Kieper, W.C., LeRoy, E., Sprent, J., and Surh, C.D. (2002). Interleukin (IL)-15 and IL-7 jointly regulate homeostatic proliferation of memory phenotype CD8⁺ cells but are not required for memory phenotype CD4⁺ cells. *The Journal of experimental medicine* 195, 1523-1532.
- Tanchot, C., and Rocha, B. (1997). Peripheral selection of T cell repertoires: the role of continuous thymus output. *The Journal of experimental medicine* 186, 1099-1106.
- Tanchot, C., Rosado, M.M., Agenes, F., Freitas, A.A., and Rocha, B. (1997). Lymphocyte homeostasis. *Seminars in immunology* 9, 331-337.
- Taylor, D.K., Neujahr, D., and Turka, L.A. (2004). Heterologous immunity and homeostatic proliferation as barriers to tolerance. *Current opinion in immunology* 16, 558-564.
- Tham, E.L., and Mescher, M.F. (2002). The poststimulation program of CD4 versus CD8 T cells (death versus activation-induced nonresponsiveness). *J Immunol* 169, 1822-1828.
- Totsuka, T., Kanai, T., Nemoto, Y., Makita, S., Okamoto, R., Tsuchiya, K., and Watanabe, M. (2007). IL-7 is essential for the development and the persistence of chronic colitis. *J Immunol* 178, 4737-4748.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76, 4350-4354.
- Trautmann, L., Janbazian, L., Chomont, N., Said, E.A., Gimmig, S., Bessette, B., Boulassel, M.R., Delwart, E., Sepulveda, H., Balderas, R.S., *et al.* (2006). Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8(+) T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nature medicine* 12, 1198-1202.
- Troy, A.E., and Shen, H. (2003). Cutting edge: homeostatic proliferation of peripheral T lymphocytes is regulated by clonal competition. *J Immunol* 170, 672-676.

- Urbani, S., Amadei, B., Tola, D., Massari, M., Schivazappa, S., Missale, G., and Ferrari, C. (2006). PD-1 expression in acute hepatitis C virus (HCV) infection is associated with HCV-specific CD8 exhaustion. *Journal of virology* 80, 11398-11403.
- Vella, A., Teague, T.K., Ihle, J., Kappler, J., and Marrack, P. (1997). Interleukin 4 (IL-4) or IL-7 prevents the death of resting T cells: stat6 is probably not required for the effect of IL-4. *The Journal of experimental medicine* 186, 325-330.
- Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., and Reutelingsperger, C. (1995). A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *Journal of immunological methods* 184, 39-51.
- Viret, C., Wong, F.S., and Janeway, C.A., Jr. (1999). Designing and maintaining the mature TCR repertoire: the continuum of self-peptide:self-MHC complex recognition. *Immunity* 10, 559-568.
- Walker, L.S., and Abbas, A.K. (2002). The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery. *Nature reviews* 2, 11-19.
- Wang, S., Bajorath, J., Flies, D.B., Dong, H., Honjo, T., and Chen, L. (2003). Molecular Modeling and Functional Mapping of B7-H1 and B7-DC Uncouple Costimulatory Function from PD-1 Interaction. *The Journal of experimental medicine* 197, 1083-1091.
- Warnock, R.A., Askari, S., Butcher, E.C., and von Andrian, U.H. (1998). Molecular mechanisms of lymphocyte homing to peripheral lymph nodes. *The Journal of experimental medicine* 187, 205-216.
- Weninger, W., Manjunath, N., and von Andrian, U.H. (2002). Migration and differentiation of CD8+ T cells. *Immunological reviews* 186, 221-233.
- Weston, S.A., and Parish, C.R. (1990). New fluorescent dyes for lymphocyte migration studies. Analysis by flow cytometry and fluorescence microscopy. *Journal of immunological methods* 133, 87-97.
- Wherry, E.J., Teichgraber, V., Becker, T.C., Masopust, D., Kaeck, S.M., Antia, R., von Andrian, U.H., and Ahmed, R. (2003). Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets. *Nature immunology* 4, 225-234.
- Wu, Z., Bensinger, S.J., Zhang, J., Chen, C., Yuan, X., Huang, X., Markmann, J.F., Kassae, A., Rosengard, B.R., Hancock, W.W., *et al.* (2004). Homeostatic proliferation is a barrier to transplantation tolerance. *Nature medicine* 10, 87-92.

Bedanken möchte ich mich bei:

Dr. Christian Blank für die Betreuung dieser Arbeit, die immer irgendwo zwischen Labor, Klinik, Amsterdam und geklauter Freizeit einen Platz fand. Ergebnisse und neue Versuchsansätze wurden stets zu jeder Tages- und Nachtzeit diskutiert.

Herrn Prof. Dr. A. Mackensen und **Frau Prof. Dr. S. Modrow** für die (fakultätsinterne) Übernahme der Betreuung dieser Dissertation, sowie **Herrn Prof. Dr. R. Andreesen** für die Möglichkeit, diese Arbeit in der Abteilung für Hämatologie und internistische Onkologie anfertigen zu können.

Tanja Schunder, die mir geholfen hat, in der Immunologie laufen zu lernen.

Joachim Schweimer, der sehr spontan Tanjas Platz übernommen hat, und auf dessen Hilfe ich bei Mammutexperimenten stets zählen konnte.

Annegret Rehm, die ihr Labor mit der AG Blank geteilt hat, und die mir stets mit Rat und Tat, Kaffee und einem offenen Ohr für Probleme zur Seite stand. Vielen Dank für große Geduld mit mir (bzw. uns) in Deinem Labor!

Allen Mitglieder der AG Mackensen, AG Edinger und AG Multhoff für die angenehmen Doktorarbeits-Jahre in der Häma/Onko!

Besonderer Dank gilt dabei **Karin Fischer, Sabine Hoves und Patty Ewing**, die am FACS, im Labor und im Tierstall oft für eine schnelle Problemlösung sorgten.

Danke an **Rüdiger Eder** für zahlreiche Zellsorting-Events, und danke an **Andrea Havasi** für eine Freundschaft über das Labor hinaus.

Christine Luginger und Lukas Kremmler

Erst ihr beide habt mich endgültig davon überzeugt, dass ich mich im Laborleben wohlfühlen kann. Danke für einen lustigen „Einarbeitungssommer“!

Vielen lieben Dank **Christine** für Deine tatkräftige Unterstützung und für Deine liebenwerte Art, stets darum bemüht, es allen recht zu machen. Ich werde Dich in Amsterdam vermissen! Bleib so wie Du bist!

Vielen Dank **Lukas**, dafür dass Du den Laboralltag stets aufgelockert hast, egal ob mit Deiner Bewerbungsmail, gewagten Sigmaplotauswertungen, kaputten Regenschirmen oder Spielereien am Computer (The Simpsons gotcha! Oder so ähnlich?). Freu' mich auf eine gemeinsame WG in Amsterdam – natürlich total friedlich und harmonisch! Aber bitte wehr Dich!

Lisa Borkner, einfach für geteilte Freude und geteiltes Leid im täglichen Laborleben. Dafür dass Du eine sehr angenehme Laborkollegin warst/bist, auf die man sich jederzeit zu hundert Prozent verlassen kann.

Man trifft sich immer zweimal im Leben..., d.h. in unserem Fall wohl eher dreimal: 5. Ebene, B1 E3 153 und Wannepad 116, Amsterdam. Oder doch...dessous le pont de Nantes? Wird mal wieder Zeit für einen Tanz ums Feuer!

Elke, Katharina, Astrid und Moni: Dank Euch war das Biologinnendasein stets um einiges schöner, lustiger und vor allem nie langweilig! Danke für die gemeinsame Zeit, in der aus fünf Quitschies fünf Dr.rer.nat. wurden.

Mein ganz besonderer Dank gilt Moni für die Freundschaft, die bereits in den ersten Tagen des Studiums begann. Ich hoffe, dass uns diese Freundschaft auch noch lange nach der gemeinsamen Abgabe zweier Doktorarbeiten verbindet!

Meinen Eltern für jede Form der Unterstützung, alles aufzuzählen würde jeden Rahmen sprengen. Lieben Dank für Eure Überzeugung, dass ich sicher den richtigen Weg gehe - wenn auch von nun an nur noch laktosefrei.

Matthias für's Zusammensein, für's Dasein, für's Lachen, für's Helfen, für's Verstehen - und für's Loslassen, damit ich jetzt mit Deinem Einverständnis Amsterdam erkunden kann.

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfsmittel Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, den

(Kerstin Schuster, Dipl.-Biol.)